

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL II
FACULTAD DE VETERINARIA

**PATOGENIA DE LA PESTE PORCINA
AFRICANA: INTERACCIÓN DEL VIRUS CON
EL SISTEMA INMUNE**

FERNANDO RAMIRO IBÁÑEZ
MADRID, 1995

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR

Reunido el Tribunal axaminador, constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis doctoral, que había escrito libremente sobre el siguiente tema:

.....
.....

Ha sido dirigida por:

Terminada la lectura y contestadas por el tesando las objeciones formuladas por los Sres. Miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de:

.....
Madrid.....de.....de 1.9.....
EL PRESIDENTE LOS VOCALES EL SECRETARIO

[Handwritten signature]

[Handwritten signature: Maria Castaneda]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

***"La creencia en la inmortalidad
procede del miedo a la muerte."***

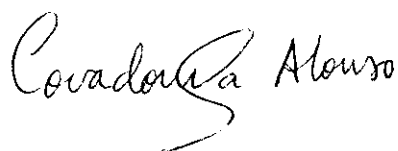
A mis padres y hermanos

A los brinzales

Tesis presentada por Fernando
Ramiro Ibáñez para optar al grado
de Doctor en Veterinaria por la
Universidad Complutense de
Madrid.

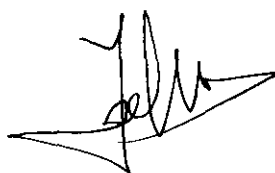
La tesis doctoral denominada Patogenia de la PPA: interacción
del virus con el sistema inmune ha sido realizada en el
Centro de Investigación en Sanidad Animal del Ministerio de
Agricultura, bajo la dirección de Covadonga Alonso Martí, y en
el Departamento de Patología Animal II bajo la tutoria de José
Luis González Arribas.

Vº Bº



Covadonga Alonso Martí

Vº Bº



José Luis González Arribas

AGRADECIMIENTOS

No es fácil dar las gracias a todas las personas y circunstancias que han influido de una u otra forma en el desarrollo y finalización de este trabajo, así que antes de particularizar, me gustaría agradecer, de todo corazón, a todos aquellos que se han cruzado en mi vida por su mayor o menor aportación a este trabajo; y pido perdón a quienes se consideren olvidados, pues no me es posible hacer una relación completa de todos ellos.

Covadonga ha sido durante estos últimos años mi mejor maestra, y ha tenido que soportar mi extraño carácter. Ella es la principal impulsora de esta tesis.

Todo el personal del Centro de Investigación en Sanidad Animal, desde el Director del Centro hasta el servicio de vigilancia se han portado de manera ejemplar, permitiéndome trabajar sin demasiadas dificultades. Especial agradecimiento a Ana, mi compañera, a quien arrebató un poco de espacio durante mis estancias en Valdeolmos.

El laboratorio L-6 del CISA puedo considerarlo mi segundo lugar de trabajo, gracias a la gentileza de José Angel y sus pupilos. Mis constantes requerimientos de consejos o material fueron y serán una continua incomodidad para ellos, que siempre dan lo mejor de sí mismos para ayudar. Paulino Gómez realizó los experimentos de neutralización con los sueros extraídos de los cerdos incluidos en nuestros modelos experimentales de infección.

Paco, el doctor Ruiz-Gonzalvo es el gran maestro y un ejemplo a seguir por todos los jóvenes que llegamos al Centro. Él ha realizado las pruebas para la caracterización de las viremias y siempre le estaré agradecido.

Quiero dar también las gracias a las personas, primero de Embajadores, y posteriormente de Valdeolmos, que resolvieron mis dudas y me enseñaron a manejar los diferentes aparatos: Javier Tomillo, Mar Babín, Ana Canals, Amparo Estepa, Ana Rodríguez, Javier Domínguez, Fernando Alonso, José Angel, Pachi, Rafa, Maribel, Carlos, Fernando, Nuria, José M^a, Pepeillo, Charo, Quique... y toda una larga lista. Gracias a todos ellos.

El Departamento de Patología Animal II me acogió cuando más lo necesitaba, aportando un nuevo estímulo para seguir con esta carrera, especialmente la Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica. Quiero dar mi agradecimiento a José Luis, que siempre tuvo confianza en mí; a María, cuyos consejos son mi mejor guía; a Nani, siempre dispuesta a enseñar; a Edu, que me cedió un hueco a su lado; a Pilar, Nines, Belén, Antonio, Laura, Marta, Manolo, Cristina, Ximena, a los internos y a Pedro, nuestro laborante, quien día tras día facilita nuestra labor en esta Unidad Docente.

A Alfredo, con su "exótica" sabiduría, ejemplo de dedicación a una causa; a Angel, Lola, Elena, y muchas otras personas del Departamento también les doy las gracias.

También envío un especial agradecimiento a Marta Barreiro y al Dr. King, de Ithaca; y a la Dra. Gerlach, a Christian y al Dr. Körbel de Munich, que me ayudaron en momentos difíciles.

Muchos amigos han estado a mi lado, apoyándome para seguir adelante y a ellos les rindo un pequeño homenaje: Felipe, José Manuel, Birki, Alfonso, Mario, Ricardo, Raúl, Mjo, Charlie, Iñigo, Luis Carlos, Jesús, Bea, Isabel, Juan Antonio, Patricia, Carolina, Nines... Mi más sincero agradecimiento.

Por último quiero dedicar este trabajo a mis padres y hermanos, y a mis fieles amigos de Brinzal.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADP: adenosín difosfato.

ARN: ácido ribonucleico.

ASF: Peste Porcina Africana.

ASFV: virus de la Peste Porcina Africana.

CID: coagulación intravascular diseminada.

CMV: citomegalovirus.

CPA: células presentadoras de antígeno.

ConA: concanavalina A.

CsA: ciclosporina A.

DMSO: dimetilsulfóxido.

dpi: días postinfección.

EBV: virus de Epstein-Barr.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

ELISA: enzimoimmunoensayo.

FeLV: virus de la leucemia felina.

FITC: fluoresceína.

FL-: tipo de fluorescencia en citometría.

FSC: en citometría, tamaño celular.

HIV: virus de inmunodeficiencia humana.

IFD: inmunofluorescencia directa.

IFI: inmunofluorescencia indirecta.

IFN: interferón.

IgMs: inmunoglobulina M de superficie.

IL-: interleuquina-.

Kb: kilobases.

KD: kilodaltons.

LCMV: virus de la coriomeningitis linfocítica.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.

MI: multiplicidad de infección.

NF-AT: factor nuclear de activación de linfocitos T.

NK: células citotóxicas naturales.

ORF: fases de lectura abierta del genoma.

PBS: solución tamponada con fosfatos.

PE: ficoeritrina.

pi: postinfección.

POD: peroxidasa.

SLA: complejo mayor de histocompatibilidad porcino.

SMF: sistema mononuclear fagocítico.

SSC: en citometría, complejidad celular.

TAE: tampón Tris-Acetato-EDTA.

TBS: solución tamponada con Tris.

Tc: linfocitos T citotóxicos.

TCR: receptor de linfocitos T.

TE: tampón Tris-EDTA.

Th: linfocitos T colaboradores.

TNF: factor de necrosis tumoral.

Ts: linfocitos T supresores.

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
II.A.- Peste Porcina Africana.....	6
1.- ETIOLOGÍA	
1.A.- Estructura del agente etiológico.....	6
1.B.- Genoma del VPPA.....	7
1.C.- Proteínas víricas.....	9
1.D.- Cultivos <i>in vitro</i>	12
2.-EPIZOOTIOLOGÍA.....	13
2.A.- Hospedadores.....	14
2.B.- Transmisión.....	15
3.- PATOGENIA.....	16
3.A.- Células diana.....	17
3.B.- Alteraciones del sistema inmunitario.....	18
3.C.- Alteraciones de la hemostasia.....	23
4.-PATOLOGÍA	
4.A.- Síntomas clínicos.....	27
4.B.- Anatomía patológica.....	28
4.B.1.- <i>Macroscopía</i>	28
4.B.2.- <i>Microscopía</i>	29
II.B.- Farmacología del sistema inmune.....	31
1.- ACTIVIDAD DE LA CSA SOBRE EL SISTEMA INMUNE.....	32
2.- EFECTOS DE SOBRE LA FUNCIONALIDAD CELULAR.....	33
3.- BIOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD DE LA CSA.....	34
4.- EFECTOS ORGÁNICOS.....	35
5.- TOXICIDAD Y EFECTOS NOCIVOS.....	36
II.C.- Interacción de los virus con el sistema inmune	

1.- INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDA POR VIRUS.....	38
2.- APOPTOSIS.....	39
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	
III.A.- Experimentos <i>in vivo</i>.....	44
1.- VIRUS.....	44
2.- ANIMALES.....	45
3.- TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR.....	45
4.- EFECTO DE LA CSA SOBRE EL VIRUS.....	46
5.- VALORACIÓN DE SÍNTOMAS Y TOMA DE TEMPERATURA.....	47
6.- VALORES HEMATOLÓGICOS.....	47
7.- ANTICUERPOS DE INFECCIÓN	
7.A.- Determinación del título de anticuerpos.....	47
7.B.- Efectos neutralizantes de los anticuerpos.....	48
8.- DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE VIRUS EN SANGRE.....	49
9.- CITOMETRÍA DE FLUJO	
9.A.- Extracción de sangre y obtención de leucocitos.....	49
9.B.- Marcaje simple, doble y triple marcaje fluorescente.....	50
9.C.- Anticuerpos como reactivos de citometría. Purificación de ascitis.....	50
9.D.- Marcaje de anticuerpos con biotina.....	52
9.E.- Adquisición de células y análisis de resultados.....	52
10. TÉCNICAS DE INMUNOCITOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA	
10.A.- Técnica de inmunocitoquímica en extensiones de citocentrífuga.....	55
10.B.- Preparación de tejidos e histopatología.....	56
10.C.- Técnica de inmunohistoquímica.....	56
III.B.- Experimentos <i>in vitro</i>	
1.- VIRUS.....	58
2.- EFECTO BLASTOGÉNICO EN CÉLULAS MONONUCLEARES EXTRAÍDAS DE SANGRE PROCEDENTE DE CERDOS INFECTADOS.....	58
3.- INFECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS MONONUCLEARES PARA EL ESTUDIO DE ANTÍGENOS SUPERFICIALES.....	59

4.- VALORACIÓN DEL EFECTO BLASTOGÉNICO EN CULTIVOS INFECTADOS.....	60
4.A. Estudio del ciclo de ADN en células infectadas.....	60
4.B.- Incorporación de timidina tritiada en células en proliferación.....	61
5.- DETECCIÓN DE APOPTOSIS Y MUERTE CELULAR EN CULTIVOS DE CÉLULAS MONONUCLEARES INFECTADAS	
5.A.- Valoración de apoptosis por morfología celular.....	61
5.B.- Valoración de muerte celular por citometría de flujo.....	61
5.C.- Valoración de apoptosis en geles de agarosa.....	62
5.D.- Valoración de apoptosis por ELISA.....	63
6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIONES GRÁFICAS.....	64
IV.- RESULTADOS	
IV.A.- Estudios <i>in vivo</i> sobre la patogenia de la PPA.....	68
1.- MODELO EXPERIMENTAL DEL VPPA ATENUADO E75CV ₁ -4.....	68
1.A.- Curso de la infección. Formas clínicas. Temperatura.....	68
1.B.- Anatomía patológica.....	72
1.C.- Análisis de parámetros de infección.....	79
1.C.1.- <i>Evolución del título de virus en sangre periférica....</i>	<i>79</i>
1.C.2.- <i>Expresión de proteínas víricas en células de cerdos infectados.....</i>	<i>80</i>
1.D.- Anticuerpos durante la infección experimental. Efecto neutralizante.....	82
1.E.- Valores hematológicos	
1.E.1.- <i>Recuentos globales de leucocitos.....</i>	<i>84</i>
1.E.2.- <i>Recuentos diferenciales de leucocitos. Células inmaduras.....</i>	<i>85</i>
1.F.- Poblaciones celulares de la respuesta inmune. Marcadores de activación	
1.F.1.- Antígenos determinados en población de linfocitos	
1.F.1.1.- <i>Expresión del antígeno CD8 en linfocitos de sangre periférica.....</i>	<i>86</i>

1.F.1.2.- Expresión del antígeno CD4 en linfocitos de sangre periférica.....	87
1.F.1.3.- Células dobles positivas CD4-CD8 en sangre periférica.....	88
1.F.1.4.- Expresión del receptor de IL-2 en linfocitos de sangre periférica.....	90
1.F.5.- Linfocitos B en sangre periférica.....	91
1.F.2.- Antígenos determinados en población de células mononucleares	
1.F.2.6.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-I o SLA-I	93
1.F.2.7.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-II o SLA-II	95
1.F.2.8.- Monocitos/macrófagos en sangre periférica.....	96
2.- MODELO EXPERIMENTAL DEL VPPA CEPA E70 VIRULENTO	
2.A.- Curso de la infección. Formas clínicas. Temperatura.....	98
2.B.- Anatomía patológica.....	100
2.C.- Análisis de parámetros de infección	
2.C.1.- Evolución del título de virus en sangre periférica...	105
2.C.2.- Expresión de proteínas víricas en células de cerdos infectados.....	105
2.C.3.-Distribución del virus en órganos de cerdos infectados.....	106
2.D.- Valores hematológicos	
2.D.1.- Recuentos globales de leucocitos.....	110
2.D.2.- Recuentos diferenciales de leucocitos. Células inmaduras.....	110
2.E.- Poblaciones celulares de la respuesta inmune. Marcadores de activación	
2.E.1.- Antígenos determinados en población de linfocitos	
2.E.1.1.- Expresión del antígeno CD8 en linfocitos de sangre periférica.....	111
2.E.1.2.- Expresión del antígeno CD4 en linfocitos de sangre periférica.....	112

2.E.1.3.- Células dobles positivas CD4-CD8 en sangre periférica.....	113
2.E.1.4.- Expresión del receptor de IL-2 en linfocitos de sangre periférica.....	114
2.E.1.5.- Linfocitos B en sangre periférica.....	115
2.E.2.- Antígenos determinados en población de células mononucleares	
2.E.2.6.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-I o SLA-I	116
2.E.2.7.-Antígenos de histocompatibilidad. MHC-II o SLA-II	117
2.E.2.8.- Monocitos/macrófagos en sangre periférica.....	118
3.- EFECTO DE LA INMUNOSUPRESIÓN FARMACOLÓGICA EN LA INFECCIÓN POR EL VPPA.....	120
3.A.- MODELO EXPERIMENTAL DEL VPPA ATENUADO E75CV ₁ -4 EN CERDOS INMUNOSUPRIMIDOS	
3.A.a- Curso de la infección. Formas clínicas. Temperatura.....	121
3.A.b- Análisis de parámetros de infección	
3.A.b.1.- Evolución del título de virus en sangre periférica	123
3.A.b.2- Expresión de proteínas víricas en células de cerdos infectados.....	126
3.A.c- Anticuerpos durante la inmunosupresión. Efecto neutralizante.....	127
3.A.d- Valores hematológicos	
3.A.d.1.- Recuentos globales de leucocitos.....	129
3.A.d.2.- Recuentos diferenciales de leucocitos. Células inmaduras.....	131
3.A.e- Poblaciones celulares de la respuesta inmune. Marcadores de activación	
3.A.e.1.- Antígenos determinados en población de linfocitos	
3.A.e.1.1.- Expresión del antígeno CD8 en linfocitos de sangre periférica.....	132
3.A.e.1.2.- Expresión del antígeno CD4 en linfocitos de sangre periférica.....	134

3.A.e.1.3.- Células dobles positivas CD4-CD8 en sangre periférica.....	135
3.A.e.1.4.- Expresión del receptor de IL-2 en linfocitos de sangre periférica.....	136
3.A.e.1.5.- Linfocitos B en sangre periférica.....	137
3.A.e.2.- Antígenos determinados en células mononucleares	
3.A.e.2.6.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-I o SLA-I.....	138
3.A.e.2.7.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-II o SLA-II.....	140
3.A.e.2.8.- Monocitos/macrófagos en sangre periférica	142
3.B.- MODELO E70 VIRULENTO	
3.B.a.- Curso de la infección. Formas clínicas. Temperatura.....	143
3.B.b.- Análisis de parámetros de infección	
3.B.b.1.- Evolución del título de virus en sangre periférica.....	144
3.B.b.2.- Expresión de proteínas víricas en células de cerdos infectados.....	145
3.B.b.3.- Distribución del virus en órganos de cerdos infectados.....	146
3.B.c.- Valores hematológicos	
3.B.c.1.- Recuentos globales de leucocitos.....	152
3.B.c.2.- Recuentos diferenciales de leucocitos. Células inmaduras.....	152
3.B.d.- Poblaciones celulares de la respuesta inmune. Marcadores de activación	
3.B.d.1.- Antígenos determinados en población de linfocitos	
3.B.d.1.1.- Expresión del antígeno CD8 en linfocitos de sangre periférica.....	154
3.B.d.1.2.- Expresión del antígeno CD4 en linfocitos de sangre periférica.....	155
3.B.d.1.3.- Células dobles positivas CD4-CD8 en sangre	

<i>periférica</i>	156
<i>3.B.d.1.4.- Expresión del receptor de IL-2 en linfocitos de sangre periférica</i>	157
<i>3.B.d.1.5.- Linfocitos B en sangre periférica</i>	158
3.B.d.2.- Antígenos determinados en población de células mononucleares	
<i>3.B.d.2.6.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-I o SLA-I</i>	159
<i>3.B.d.2.7.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-II o SLA-II</i>	160
<i>3.B.d.2.8.- Monocitos/macrófagos en sangre periférica</i>	161

IV.B.- Estudios *in vitro* sobre la patogenia de la PPA

1.- MODIFICACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS SUPERFICIALES EN CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE

1.A.- Expresión de antígenos celulares: SLA-II DRw, SLA-I, CD44, CD11a.....	163
---	-----

2.- INTERFERENCIA DEL VPPA CON FUNCIONES LINFOCITARIAS

2.A.- Inhibición de la blastogénesis en células estimuladas con mitógenos.....	166
--	-----

<i>2.A.1.- Incorporación de timidina tritiada en células de cerdos infectados</i>	166
---	-----

<i>2.A.2.- Expresión del receptor de IL-2 en células de cerdos infectados</i>	167
---	-----

<i>2.A.3.- Incorporación de timidina tritiada en células infectadas in vitro</i>	169
--	-----

2.B.- Efectos del VPPA sobre el ciclo del ADN en linfocitos.....	172
--	-----

3.-INTERFERENCIA DEL VPPA CON MECANISMOS REGULADORES DE LOS LINFOCITOS: APOPTOSIS O MUERTE CELULAR PROGRAMADA.....

3.A.- Criterios morfológicos

<i>3.A.1.- Examen microscópico de las células</i>	174
---	-----

<i>3.A.2.- Análisis de las células muertas por citometría de flujo -Tamaño-complejidad</i>	179
--	-----

- <i>Captación de yoduro de propidio</i>	180
3.B.- Criterios moleculares de muerte celular programada	
3.B.1.- <i>Fragmentación del ADN en geles de agarosa</i>	182
3.B.2.- <i>Cuantificación de la fracción de histonas asociadas a los fragmentos de ADN generadas en el proceso de apoptosis</i>	183
V. DISCUSIÓN	
1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y CINÉTICA DE LA INFECCIÓN.....	189
1.a.- Sintomatología.....	190
2.- ANTÍGENOS SUPERFICIALES Y CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE.	198
2.A.- Respuestas que indican activación de determinados elementos del sistema inmune	
-Linfocitos T durante la infección.....	201
2.B.- Antígenos de Histocompatibilidad durante la infección.....	204
2.C.- Modulación de antígenos de Histocompatibilidad <i>in vitro</i> ..	208
2.D.- Linfocitos B durante la infección.....	210
2.E.- Variaciones que apuntan a un posible defecto funcional del sistema inmune.....	211
2.F.- La célula diana: Monocitos/macrófagos durante la infección	213
3.- RESPUESTAS CELULARES DURANTE LA INFECCIÓN.....	217
VI.- CONCLUSIONES	223
VII.- BIBLIOGRAFÍA	227
VIII.- RESUMEN	278
IX.- SUMMARY	279

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En algunas zonas de este y de otros países la sola mención de la enfermedad Peste Porcina Africana puede traer a la memoria recuerdos muy desagradables, cuando los sacrificios masivos de cerdos fueron el único remedio para la erradicación o el control de la enfermedad.

Estos hechos supusieron la catástrofe económica de cientos de explotaciones en nuestro país y la paralización de un comercio de productos alimentarios derivados del porcino que, en aquellos momentos era de los más activos de nuestra economía.

Hoy en día la enfermedad se mantiene controlada bajo vigilancia especial, aunque dispuesta a extenderse a otras provincias ante el menor descuido, en zonas de Huelva, Córdoba y Sevilla donde se realiza un control serológico periódico en busca de portadores inaparentes. Recientemente (noviembre, 1994) la situación de Extremadura ha quedado definida como libre de la enfermedad por la Unión Europea, permitiéndose el comercio de productos derivados del porcino. Además, y también recientemente (octubre, 1994) se ha abierto el comercio hacia los Estados Unidos de productos curados derivados del cerdo.

Todo ello demuestra que, a pesar de que la enfermedad hace tiempo que se mantiene controlada y sin nuevos brotes en zonas libres, la repercusión comercial ha sido realmente grave hasta hace pocos meses, y lo seguirá siendo durante bastantes años.

La principal razón que justifica el hecho de que la enfermedad siga siendo una amenaza para la cabaña porcina es pues la existencia de portadores inaparentes de la enfermedad, potenciales transmisores de la misma, así como la inexistencia de una vacuna para la protección en áreas susceptibles.

Este virus, aún sin clasificar, es el único arbovirus (virus con ciclo en artrópodos) cuyo genoma es un ADN bicatenario, y el gran número de proteínas que codifica asemejan su maquinaria genómica a los poxvirus. Por esta razón, el virus vaccinia, uno de los poxvirus mejor conocidos, se utiliza como modelo en algunos estudios del virus de la Peste Porcina Africana (VPPA). Hoy en día se han conseguido enormes progresos en la caracterización de proteínas y en desvelar la funcionalidad de las mismas durante el desarrollo de la infección.

En virología los mayores avances se han logrado tras la obtención de vacunas efectivas frente a la enfermedad que producen. El virus del SIDA ha sido la gran excepción ya que, al igual que para el VPPA, no existe una vacuna efectiva contra estos virus. A pesar de ello se ha conseguido el establecimiento de sistemas y modelos de trabajo adecuados para la virología del futuro más próximo, principalmente en los estudios de patogenia.

Los nuevos métodos de biología molecular han permitido el manejo del genoma del virus y la creación de vectores recombinantes y de virus delecionados que son una de las principales fuentes de nueva información de los ciclos biológicos de estos agentes infecciosos que contemplamos.

Las interacciones del virus con el sistema inmune en la patogenia de la Peste Porcina Africana son de gran interés, ya que sus principales células diana son las células del sistema mononuclear fagocitario. Por ello nos planteamos un desarrollo experimental con los siguientes objetivos principales:

1.- Estudiar la patogenia de dos modelos del virus de la peste porcina africana con relevancia en protección, uno atenuado y otro virulento; analizando sus posibles interacciones el sistema inmune del huésped. (Análisis de los diferentes cuadros clínicos).

2.- Comparar el desarrollo de la infección en animales inmunocompetentes o en condiciones de inmunosupresión farmacológica mediante la administración de ciclosporina A. Parámetros de infección en animales inmunocompetentes y

sometidos a inmunosupresión farmacológica.

3.- Caracterizar la fracción de células infectadas en sangre circulante mediante la expresión de una proteína de membrana del virus (p30) utilizando citometría de flujo. Estudio inmunohistoquímico de los tejidos con anticuerpos frente al virus.

4.- Caracterizar las variaciones en la expresión de antígenos superficiales de células del sistema inmune durante la infección con su posible influencia en el curso de la enfermedad.

5.- Correlacionar los datos encontrados *in vivo* con el análisis *in vitro* de parámetros críticos en respuesta inmune: respuesta proliferativa linfocitaria a mitógenos, expresión del receptor de IL-2. Se estudiaron distintos factores estimulantes e inhibidores en un sistema *in vitro*.

6.- Estudio del efecto del virus sobre distintas funciones y mecanismos reguladores de los linfocitos: inhibición de la blastogénesis linfocitaria.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

PESTE PORCINA AFRICANA

El virus de la Peste Porcina Africana produce una enfermedad infecciosa de alta contagiosidad que afecta principalmente a suinos, caracterizada por producir fiebre elevada, alteraciones multisistémicas de tipo congestivo-hemorrágicas, así como otros trastornos orgánicos funcionales que pueden llevar a la muerte del animal.

1.- ETIOLOGÍA DE LA PPA.

1.A.-Estructura del agente etiológico.-

El virus presenta una estructura de simetría icosaédrica con envuelta externa, clasificándose dentro de los deoxivirus citoplásmicos por su tipo de replicación (Breese y DeBoer, 1966; Almeida *et al*, 1967; Carrascosa *et al*, 1984). En un principio el virus se clasificó dentro de la familia Iridoviridae aunque también presenta propiedades semejantes a los poxvirus (Hess, 1971; Viñuela, 1985; Kuznar *et al*, 1981; Arzuza *et al*, 1992). La tendencia actual es a encuadrarlo dentro de una nueva familia aún por clasificar que por el momento solo estaría integrada por el virus de la Peste Porcina Africana (Viñuela, 1985; Brown, 1986).

Los virus extracelulares tienen un tamaño aproximado de 200 nm y poseen una envuelta externa, parcialmente destruida en algunos casos, captada de la membrana de la célula hospedadora tras la exocitosis (Breese y DeBoer, 1966;

Breese *et al*, 1967; Moura-Nunes *et al*, 1975). Esta envuelta no resulta necesaria para mantener la infectividad del virus, pues tanto virus intra como extracelulares son infectivos (Breese y DeBoer, 1966; Tabarés, 1980; Arzuza *et al*, 1992).

Por debajo de la envuelta externa las partículas víricas presentan una cápside más gruesa, de unos 191 nm de diámetro (Breese *et al*, 1967; Carrascosa *et al*, 1984).

Internamente a esta cápside encontramos otra membrana lipídica, de morfología similar a la membrana externa y posiblemente asociada a las unidades morfológicas de la cápside. Esta membrana rodea a la nucleoproteína o nucleoide central (Carrascosa *et al*, 1984). El nucleoide central posee un diámetro entre 70-100 nm y aparece como un modelo regular de fibras densas que sugieren la presencia de actina, al igual que en la organización observada en el caso de otros virus (Moura-Nunes *et al*, 1977; Tabarés y Ruiz-Gonzalvo, 1983).

1.B.-Genoma del VPPA.-

El ADN bicatenario lineal propio de estos virus tiene un peso molecular aproximado de 10^8 kD y posee unos 170 pares de kilobases (kb) (Enjuanes *et al*, 1976; Viñuela, 1987). Presenta extremos terminales con repeticiones invertidas en una longitud de 2.4 kb (Sogo *et al*, 1984) y uniones finales en horquilla de 37 nucleótidos compuestos casi en su totalidad por residuos Adenina y Timina no emparejados (Ortín *et al*, 1979; Viñuela, 1987). Los lazos en cada extremo del ADN están presentes en dos formas equimolares, que cuando se comparan en polaridades opuestas, son invertidas y complementarias (flip-flop) como las observadas en el caso del virus vaccinia (Baroudy *et al*, 1981).

Dentro de la estructura genómica se han identificado varias familias multigénicas, relacionadas con las repeticiones internas, denominadas 110, 360 y 505 (Almendral *et al*, 1990; González *et al*, 1993; Rodríguez *et al*, 1994). La

función de estas familias no se conoce hasta el momento, aunque se especula que su función puede estar en relación con la infectividad en el vector Argásido (Agüero *et al*, 1990).

Algunas de las fases de lectura abierta (ORF) del virus presentan ciertas homologías con secuencias génicas que codifican proteínas de importancia en animales vivos (Carrascosa A.L. *et al*, 1985). Así se han encontrado homologías con los genes que codifican la región extracelular de la molécula de adhesión CD2 de linfocitos T (Rodríguez *et al*, 1993). La proteína codificada por este gen interviene en el mecanismo de hemadsorción del virus (Rodríguez *et al*, 1993; Ruiz-Gonzalvo y Coll, 1993).

Otra curiosa homología hallada recientemente es la compartida con el protooncogen *bcl-2* y con el gen del virus de Epstein-Barr *BHRF1*. Las proteínas codificadas por esos dos genes intervienen en los mecanismos de supresión de la apoptosis en las células donde se expresan, por lo que se especula que este gen del VPPA podría intervenir en los mecanismos de persistencia del virus (Neilan *et al*, 1993).

Aunque presenta otras homologías estructurales, citar por último el gen 23-NL que codifica una proteína intranuclear en células infectadas. Este gen presenta homologías con un factor de neurovirulencia del virus Herpes Simplex ICP34.5 así como con el factor de diferenciación mieloide MYD116 (Afonso *et al*, 1994.; Zsak *et al*, 1994, comunicaciones personales). Su importancia a nivel funcional está poco estudiada aunque los primeros avances sugieren que es un gen no esencial para el crecimiento en cultivos o para la virulencia en cerdos, puesto que se encuentran aislados salvajes del virus con el gen truncado (Zsak *et al*, 1994, comunicación personal).

Recientemente se han secuenciado 50 kb del extremo derecho del genoma completo del virus (Dixon *et al*, 1993) obteniéndose algunas secuencias de posible interés funcional.

De igual forma se ha secuenciado el genoma completo del aislado atenuado

BA71, todo lo cual abre nuevos senderos para el conocimiento de la actividad de proteínas codificadas por el virus (Yañez *et al*, 1994, comunicación personal).

1.C.-Proteínas víricas.-

Las proteínas víricas podemos agruparlas en proteínas estructurales, proteínas de infección, proteínas antigénicas y proteínas con actividad enzimática (Tabarés *et al*, 1980; 1980a; 1983).

El virus consta de unos 54 polipéptidos estructurales codificando aproximadamente unas 100 proteínas en cultivos de líneas celulares y unas 86 en cultivos de macrófagos porcinos con un peso molecular comprendido entre 9.5 y 243 K (Esteves *et al*, 1986; Santarén *et al*, 1986; Urzainqui *et al*, 1987; Alcaraz *et al*, 1988; 1992).

Los polipéptidos estructurales mayoritarios del virus intracelular son la p172, p73, p46, p42, p36 y p15, pudiendo corresponder la p42 a actina celular. Los polipéptidos p73, p15, y p11.5 forman parte de la envuelta más externa (Tabarés *et al*, 1980; 1983).

Las proteínas inducidas durante la infección se han estudiado tanto en su célula hospedadora natural (macrófagos porcinos) como en otras líneas celulares (Wardley, 1977; Forman *et al*, 1983; Casal *et al*, 1984).

El virus induce la expresión de proteínas en la membrana de la célula hospedadora que pueden mediar interacciones con componentes del sistema inmunitario, tal y como se observa en experiencias realizadas *in vitro*, aunque aún no está establecida su relevancia en el animal vivo (Mallon *et al*, 1985; Goudsmit *et al*, 1988; Schlesinger *et al*, 1990; Alcaraz *et al*, 1992). Los datos experimentales revelan que la mayoría de los antígenos víricos que se detectan en la superficie de las células infectadas aparecen a tiempos tempranos durante la

infección, antes incluso de que se produzcan nuevos virus infectivos aunque algunos como la p35 puede clasificarse como antígeno tardío, ya que se sintetiza durante y tras la replicación del ADN vírico (Alcaraz *et al*, 1992).

La regulación en la síntesis de polipéptidos inducidos por el virus es compleja y mediante la utilización de inhibidores específicos de la síntesis de proteínas, de ARN o de ADN se han diferenciado proteínas que se sintetizan en diferentes fases del ciclo replicativo (Esteves *et al*, 1986; Escribano y Tabarés, 1987). Esto ha permitido clasificarlas en proteínas tempranas que se expresan antes del comienzo de la síntesis de ADN vírico y proteínas tardías que se expresan durante o tras la síntesis del ADN vírico (Weintraub y Dales, 1974; Koszinowski *et al*, 1976; Escribano y Tabarés, 1987). Todas las proteínas virales se detectan dentro de las 8 primeras horas postinfección (Tabarés *et al*, 1980a; Alcaraz *et al*, 1992).

Algunas de las proteínas de infección más importantes del virus, como el componente mayoritario del core p172, de la cápside p73 y de la envuelta p15 y p11.5 en virus intracelulares son proteínas tardías (Escribano y Tabarés, 1987). Otras como la proteína de membrana p30 se clasifican como proteínas tempranas (Afonso *et al*, 1992; Alcaraz *et al*, 1992).

Se ha detectado un procesamiento de proteínas del virus durante la síntesis de viriones, mediante la producción de una poliproteína 220 kD (mecanismo típico de virus ARN y retrovirus) que tras su proteólisis da lugar a la formación de varias proteínas estructurales (p150, p37, p34, p14) (Simón-Mateo *et al*, 1993).

La formación de las estructuras víricas tiene lugar en el citoplasma de la célula hospedadora (Breese y DeBoer., 1966; Moura-Nunes *et al*, 1975), aunque mediante fraccionamiento celular con detergentes se han encontrado al menos 10 polipéptidos asociados al núcleo celular que podrían estar implicados en la síntesis de ADN vírico (Ortín y Viñuela, 1977; Tabarés y Sánchez-Botija, 1979; Tabarés *et al*, 1980; Zsak *et al*, 1994, comunicación personal). Sin embargo, la existencia de

alguna fase del ciclo replicativo del virus en el interior del núcleo de la célula hospedadora continúa siendo controvertida (Pan *et al*, 1980; Viñuela, 1985; Galo y Nunes-Petisca, 1990).

Son varias las proteínas antigénicas capaces de inducir la producción de anticuerpos en el hospedador en diferentes fases a lo largo de la infección (Tabarés *et al*, 1980; 1980a; Letchworth y Whyard, 1984; Whyard *et al*, 1985; Alcaraz *et al*, 1988). Las proteínas más inductoras de anticuerpos son la p12, p30, p54, p73, siendo la p54 una de las más tempranas inductoras (Whyard *et al*, 1985; Alcaraz *et al*, 1988; Alcaraz *et al*, 1992a; Rodríguez F. *et al*, 1994).

Numerosos estudios llevados a cabo mediante adaptación del virus a cultivos *in vitro* en diferentes tipos celulares o en líneas establecidas, han demostrado la existencia de variaciones en sus propiedades antigénicas y en su estructura (Moura Nunes *et al*, 1975; Wesley y Pan, 1982; García Barreno *et al*, 1986; Esteves *et al*, 1986; Blasco *et al*, 1989; Agüero *et al.*, 1990). Una de las proteínas víricas que presenta diversificación estructural mediante pases en cultivos de células es la p54, aunque estos cambios no influyen en las propiedades antigénicas de las diversas variantes (Alcaraz *et al*, 1992a; Rodríguez F. *et al*, 1994). Aún no se ha determinado la importancia que puede tener este fenómeno de variabilidad en la patogenia de la infección *in vivo*. También se han determinado cambios en la estructura antigénica de la proteína mayoritaria p73 que se supone influyen en los mecanismos de evasión de la neutralización de algunas subpoblaciones víricas (Zsak *et al*, 1993).

La unión del virus a las células hospedadoras tiene lugar mediante la proteína p12, con un peso molecular de 17 kD en partículas maduras. Esta proteína

presenta al menos un epítipo externo y un epítipo interno en la estructura del virión. Los anticuerpos desarrollados durante infecciones naturales frente a la proteína no inhiben la unión del virus a la célula hospedadora ni neutralizan su infectividad (Carrascosa A.L. *et al*, 1993; Angulo *et al*, 1993).

1.D.- Cultivos *in vitro*.-

El virus se ha conseguido adaptar a cultivo de leucocitos de sangre periférica, a cultivo de células de médula ósea, a líneas celulares de riñón de cerdo o de mono, así como a cultivos primarios de macrófagos (Malmquist y Hay, 1960; Wardley y Wilkinson, 1977; Wardley *et al*, 1979; Pan *et al*, 1980; Carrascosa *et al*, 1982; Casal *et al*, 1984).

Estudios realizados para comprobar la vía de entrada del virus en las células han demostrado la existencia de un receptor que media la endocitosis tras saturación de los puntos de unión (Alcamí *et al*, 1989; 1990), estimándose en unos 10^4 el número de receptores celulares, similar al número detectado para receptores celulares de otros virus. También se han detectado uniones en la membrana plasmática en lugares no saturables como las mencionadas para otros sistemas (Tardieu *et al*, 1982). Sólo la unión del virus a puntos saturables parece mediar una infección productiva. La ausencia de replicación vírica en macrófagos de otras especies, aún existiendo síntesis de proteínas tempranas del virus (p24, p26, p34, p38) ha sido asociado a la falta de receptores específicos para el virus en esas células (Alcamí *et al*, 1990).

El efecto citopático del virus en cultivos celulares se caracteriza por redondeamiento con formación de grupos celulares, vacuolización del retículo endoplásmico con un aumento de las estructuras lisosomales y presencia de centros de replicación vírica en el citoplasma (Wardley *et al*, 1979). En el núcleo aparece condensación de la cromatina presentándose formaciones características

a lo largo de la membrana interna y separación de las unidades de membrana. Al final se produce lisis del núcleo y aparecen gránulos electrodensos en el citoplasma (Moura Nunes, 1975; Wardley *et al*, 1983; Knudsen *et al*, 1987a).

En cultivos de monocitos infectados con virus virulento se observa un alto grado de infección y destrucción masiva a partir de los 2 días postinfección (Forman *et al*, 1983). Sin embargo en cultivo de macrófagos se ha observado un nivel de infección menor y mayor supervivencia de las células, con lo que podría ser uno de los tipos celulares implicados en persistencia del virus, como ya ha sido demostrado en algunos trabajos (Wardley *et al*, 1979; Carrillo *et al*, 1994).

2.- EPIZOOTIOLOGÍA

Los primeros brotes detectados de la enfermedad se produjeron en Kenia en 1907, tras diversas importaciones de cerdos domésticos desde Europa que fueron mantenidos en régimen abierto. Desde el primer momento se supuso la intervención de cerdos salvajes en la transmisión de la enfermedad (Montgomery, 1921; 1921a).

Conforme se iba introduciendo ganado porcino en las diferentes colonias europeas en África, la enfermedad fue apareciendo en otras zonas, y actualmente se mantiene como enfermedad enzoótica en gran parte del continente africano (Sánchez-Vizcaíno *et al*, 1992).

La enfermedad entró en Europa a través de la Península Ibérica en el año 1957 (Manso Ribeiro *et al*, 1958), posiblemente a través de carnes y alimentos importados por Portugal procedentes de sus colonias africanas de Angola y Mozambique. Apareció primero en Portugal y poco después se extendió al sudoeste español, en donde los sistemas de explotación porcina en extensivo característicos

de las dehesas extremeñas y castellanas han venido favoreciendo su difusión y permanencia desde el año 1960 (Polo Jover y Sánchez Botija, 1961).

A partir de este momento la enfermedad se extendió por Europa Occidental y América Central y del Sur, con enormes pérdidas económicas directas e indirectas, y con graves repercusiones en el comercio internacional de productos derivados del cerdo. Diversas medidas de policía sanitaria permitieron la erradicación de la enfermedad en Sudamérica, países caribeños y Europa del Norte. Sin embargo los sistemas de explotación porcina tradicionales en zonas como Cerdeña, sur de Portugal y Sudoeste de España fueron un obstáculo para su total erradicación y se ha mantenido como enfermedad enzoótica, apareciendo en procesos cíclicos de alta y baja virulencia (Sánchez-Vizcaíno *et al*, 1988).

Como consecuencia de la falta de una vacuna efectiva contra a la enfermedad, el único sistema a nuestro alcance para llevar a cabo el control de epizootías debe estar basado en la identificación rápida del proceso mediante la detección de anticuerpos en animales sospechosos, y en un posterior vaciado sanitario de las granjas afectadas (Hamdy *et al*, 1981; Wardley *et al*, 1983; Escribano *et al*, 1989).

2.A.- Hospedadores.-

El virus es capaz de producir infección en todas las especies de la familia Suidae en las que ha sido probado, aunque la sensibilidad de los diferentes hospedadores varía enormemente (Montgomery, 1921; 1921a; Polo Jover y Sánchez-Botija, 1961; De Tray, 1963; Heuschele y Coggins, 1965). Otras familias del orden Suiformes en las que se ha probado la infectividad del virus han demostrado ser resistentes (De Tray, 1963; Heuschele y Coggins, 1965; Viñuela, 1985).

Las garrapatas del género *Ornithodoros* son otros hospedadores naturales del virus que es el único Arbovirus conocido que posee un genoma expresado como

ADN bicatenario (Plowright *et al*, 1966). El virus se ha aislado en *Ornithodoros coriaceus* en España (Sánchez-Botija, 1963), de *Ornithodoros moubata* en África (Plowright *et al*, 1969), habiéndose demostrado también su existencia en al menos otras cuatro especies (Mellor y Wilkinson, 1985; Hess *et al*, 1987).

Parece ser que el virus tiene como hospedador primario a las garrapatas, en las cuales se transmite por vía trans-estádica y trans-ovárica, persistiendo en la naturaleza en estos insectos (Plowright *et al.*, 1969).

2.B.-Transmisión.-

La entrada del virus en los diferentes países ha tenido lugar normalmente a través de la introducción de cerdos vivos infectados o de productos derivados de los mismos, procedentes de países con la enfermedad enzoótica, ya que no era infrecuente el uso de restos de comida procedente de barcos o aviones para la alimentación del ganado porcino (DeTray, 1963; Coggins, 1974; Sánchez-Botija, 1982).

Una vez introducido el virus en un país virgen, los primeros casos se manifestaban como una enfermedad aguda, con elevada mortalidad y características poco específicas (Sánchez-Botija, 1963; Colgrove *et al*, 1969). El agente sufrió un proceso de adaptación al hospedador, aumentando los procesos crónicos y apareciendo animales persistentemente infectados que tienen gran importancia en la transmisión y mantenimiento de la infección (Moulton y Coggins, 1968; Coggins, 1974; Wardley *et al*, 1983). Así pues, la enfermedad se mantiene en una zona debido a la existencia de portadores suinos inaparentes así como de artrópodos vectores infectados (Sánchez-Botija, 1982; Pujols *et al*, 1991).

La transmisión se produce con rapidez entre animales susceptibles ya que el virus se excreta en orina y heces, y permanece durante bastante tiempo en

sangre, siendo muy estable en estas sustancias orgánicas (Montgomery, 1921; 1921a; Geiger, 1937; Kovalenko, 1965; McVicar, 1984). La transmisión mecánica a través de personas, vehículos, material de granjas, etc..., parece también bastante relevante en la epizootiología de la enfermedad (Sánchez-Botija, 1982; Wardley *et al*, 1983). Finalmente reseñar la transmisión mediante artrópodos que puede influir de forma decisiva en la creación de focos enzoóticos (Sánchez-Botija, 1963; Hess *et al*, 1987; Sánchez-Vizcaíno *et al*, 1988).

3.- PATOGENIA

Debido a la alta complejidad estructural del virus y a la gran variedad de proteínas que induce en células infectadas, muchas de las interacciones entre virus y hospedador resultan aún desconocidas.

La vía principal de entrada es la oro-nasal (Montgomery, 1921; Plowright *et al*, 1969; Colgrove *et al*, 1969; Wardley *et al*, 1983) y la multiplicación inicial del virus se produce en las tonsilas, tejido linfoide faríngeo y tracto respiratorio superior (Heuschele *et al*, 1966; Moura Nunes y Nunes Petisca, 1983; McVicar, 1984). Posteriormente el virus puede localizarse en ganglios linfáticos regionales (región cervicocefálica) para diseminarse vía linfohematógena al resto del organismo (Plowright *et al*, 1969; Coggins, 1974). El virus circula en la sangre fundamentalmente unido a hemátíes, en cuya fracción se aíslan las mayores cantidades de virus (Quintero *et al*, 1986; Genovesi *et al*, 1988). El VPPA se adsorbe a los eritrocitos gracias a una hemaglutinina vírica que presenta homología con el antígeno CD2 de las células del sistema inmunitario (Ruiz-Gonzalvo y Coll, 1993; Rodríguez *et al*, 1993).

Una vez distribuido por el organismo, el virus se multiplica en diferentes órganos (centros de replicación secundaria) como bazo, hígado y médula ósea, en los cuales se detecta una rápida evolución de los títulos de virus a los 2 días postinfección (Heuschele *et al*, 1966; Coggins, 1974; Edwards *et al*, 1985). La

infección generalizada de éstos y de otros órganos se produce a partir de los 3 días postinfección y puede coincidir con la fase febril de la enfermedad (Plowright *et al*, 1969; Hess, 1971).

En algunos casos se han mencionado otras vías alternativas de infección primaria, aunque parecen poco importantes en la patogenia de la enfermedad natural (Plowright *et al*, 1969; Colgrove *et al*, 1969).

3.A.-Células diana.-

Las principales células diana del virus son los componentes del sistema mononuclear fagocitario (SMF) y fundamentalmente los macrófagos (Enjuanes *et al*, 1976a; Wardley y Wilkinson, 1977; Casal *et al*, 1984). Dada la importancia de los macrófagos en la respuesta de defensa del organismo, las alteraciones del sistema inmunitario son decisivas en la patogenia de la enfermedad (Colgrove *et al*, 1969; Plowright *et al*, 1969).

Dentro de las diferentes subpoblaciones de macrófagos, se ha comprobado que resultan más susceptibles a la infección los macrófagos con fenotipo CD44⁺ no inflamatorio y de baja actividad fagocítica (McCullough *et al*, 1993).

Mediante inmunofluorescencia se ha comprobado que en la mayor parte de los órganos las células más afectadas son macrófagos y células reticulares, mientras que en sangre y médula ósea se afectan fundamentalmente monocitos y, de forma ocasional, granulocitos y megacariocitos (Colgrove, 1968; Colgrove *et al*, 1969). La fluorescencia con anticuerpos policlonales se detecta de forma difusa por todo el citoplasma o en forma de inclusiones intracitoplásmicas redondeadas de localización yuxtannuclear o marginal (Colgrove, 1968).

Existen otras células en las cuales puede detectarse el virus como los hepatocitos (Sierra *et al*, 1987; Fernández *et al*, 1992; 1992b), células reticulares (Pan, 1987), megacariocitos y plaquetas (Edwards *et al*, 1985; Naser *et al*, 1986;

Neser y Cotzee, 1987), células endoteliales (Wilkinson *et al*, 1978; Sierra *et al*, 1989; Fernández *et al*, 1992; 1992b), neutrófilos (Casal *et al*, 1984), células epiteliales (Pérez, 1992), linfocitos (Wardley *et al*, 1977), fibroblastos y células musculares lisas (Hervás *et al*, 1994); aunque por el momento la relevancia de la infección de esas células en la patogenia de la enfermedad no está claramente establecida.

3.B.-Alteraciones del sistema inmunitario.-

El efecto *in vivo* del virus virulento supone una destrucción celular en determinados tejidos como bazo, ganglios y otras formaciones linfoides, observándose una disminución de macrófagos (Mínguez *et al*, 1988; González-Juarrero *et al*, 1992). Durante las infecciones con aislados atenuados se produce una hipertrofia de estructuras linfoides, con aumento del número de células del SMF, y presencia frecuente de mitosis (Konno *et al*, 1969; 1972; González-Juarrero *et al*, 1992).

A lo largo de la infección con aislados de baja virulencia ha podido detectarse una leucopenia transitoria, con linfocitopenia y neutrofilia, que coincidía en el tiempo con el pico febril, durante las primeras fases de la infección. Esta situación se normalizaba a partir de la segunda semana postinfección, para presentar con posterioridad otra ligera leucopenia hacia la cuarta semana. Esta leucopenia transitoria no fue observada con el aislado DR-II y se mantuvieron valores de glóbulos blancos por encima de los basales durante infecciones experimentales con este virus (Sánchez-Vizcaíno *et al*, 1981; Knudsen y Genovesi, 1987; Genovesi *et al*, 1988).

El porcentaje de monocitos circulantes durante la infección aumentó sobre niveles basales y permaneció elevado a lo largo de la infección (Genovesi *et al*, 1988).

Las respuestas de los linfocitos a la infección son considerables y presentan

diferencias según los aislados implicados. Algunos autores han observado una disminución de linfocitos B (Wardley y Wilkinson, 1980), pero otros han descrito un descenso del número de linfocitos T, así como de la funcionalidad de los mismos (Sánchez-Vizcaíno *et al*, 1981).

La existencia de un elevado título de anticuerpos frente al virus podría explicarse por el desarrollo de una respuesta a antígenos T independientes por lo que las alteraciones funcionales de linfocitos T no alterarían esta reacción inmunitaria (De Boer *et al*, 1972; Genovesi *et al*, 1988; Passaquala *et al*, 1988).

La actividad de los macrófagos también parece afectarse durante la infección *in vivo*, al detectarse una disminución de su capacidad fagocítica y una disminución en la liberación de fosfatasa ácida por esas células (Mebus y Gregg, 1985). Igualmente existe un descenso de los procesos de quimiotaxis y respiración oxidativa, aunque no parece que se afecte la expresión de algunos receptores ni otras funciones como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Lawman *et al*, 1987; Martins *et al*, 1988). El principal efector de la citólisis dependiente de anticuerpos sería el polimorfonuclear neutrófilo, y se desarrolla a partir de la segunda semana postinfección (Norley y Wardley, 1983; Wardley *et al*, 1985).

Sin embargo se ha descrito una disminución de la expresión de antígenos del SLA-I y SLA-II a partir de los 3 días postinfección, que en aislados de baja virulencia revierte y pasa a existir una sobreexpresión. El aumento en la expresión de SLA-I y SLA-II puede ser debido a la liberación de interleuquinas como el IFN y en el medio (Wong *et al*, 1983), y sugiere la existencia de una activación celular en el caso de aislados de baja virulencia (González-Juarrero *et al*, 1992).

Las respuestas proliferativas *in vitro* de linfocitos de cerdos infectados inducidas por diferentes virus, tanto homólogos, como heterólogos o inactivados, han demostrado la inducción de un aumento de la población de linfocitos T CD8⁺, siendo este incremento mayor tras la estimulación con virus homólogos (Canals *et al*, 1992).

Existen mecanismos de citotoxicidad desarrollados por diferentes

poblaciones de linfocitos en respuesta a la infección por aislados poco virulentos (Norley y Wardley, 1983a; Scholl *et al*, 1989; Martins *et al*, 1993). En cultivos celulares procedentes de animales infectados se ha observado la inducción de linfocitos T citotóxicos con restricción por el MHC-I, produciendo la lisis de macrófagos porcinos infectados con virus homólogo (en mayor grado) y heterólogo (menos efectivo). Esta actividad fue inhibida por anticuerpos monoclonales frente al antígeno linfocitario CD8 (Martins *et al*, 1993). Durante este proceso se observó una pérdida de la restricción inmunológica a partir del cuarto día de estimulación celular (Scholl *et al*, 1989; Martins *et al*, 1993), siendo atribuida dicha actividad al desarrollo de citotoxicidad activada por linfoquinas (LAK) (Martins *et al*, 1993). El virus de la peste porcina africana es capaz de estimular una elevada producción de IL-2 en cerdos infectados, que se correlaciona con la aparición de citotoxicidad no restringida inmunológicamente (Scholl *et al*, 1989).

Otro tipo de actividad citotóxica, como la desarrollada por células citotóxicas naturales (NK) no parece efectiva durante la infección por el virus (Norley y Wardley, 1983a; Mendoza *et al*, 1991). La causa de esta débil capacidad funcional podría estar en relación con el hecho de que el virus de la PPA es un pobre inductor de interferón, citoquina que estimula la actividad de esas células (Norley y Wardley, 1983a). También se ha mencionado que la hipertermia desarrollada durante la infección podría actuar en contra de la actividad de las células NK (Wardley y Wilkinson, 1985). En contradicción con este proceso, algunos autores han observado niveles aumentados de actividad citotóxica natural en cerdos infectados, tras la inoculación de un aislado no hemadsorbente (Martins *et al*, 1993).

Varios trabajos han mencionado la inducción de la liberación de inhibidores solubles en células infectadas por el virus (Passaquala *et al*, 1988; Martins *et al*, 1988; González *et al*, 1990; Santos Ribeiro *et al*, 1991). Esas sustancias inhibirían la respuesta de un cultivo de linfocitos sometido a diferentes estímulos mitogénicos o inhibirían algunas funciones metabólicas en células no infectadas (Martins *et al*, 1988). La inhibición observada era independiente de la infectividad (González *et al*, 1990) y ha sido relacionada con la activación de células T supresoras tras una

activación policlonal de linfocitos B, de forma que una sobreestimulación del sistema inmune induciría la inmunosupresión (Santos Ribeiro *et al*, 1991).

En la infección producida por el VPPA existe una alteración de algunas respuestas inmunitarias en animales infectados con virus virulento (Mebus y Gregg, 1985; González-Juarrero *et al*, 1992) mientras que en animales infectados con virus poco virulento parece existir una respuesta normal o incluso desproporcionada (Moulton *et al*, 1975; Pan *et al*, 1975).

En animales infectados con el virus de la peste porcina africana se desarrolla una hipergammaglobulinemia como consecuencia de una activación policlonal de linfocitos B (De Boer *et al*, 1972). Esta activación puede estar producida por una continua estimulación antigénica debido a la presencia de prolongadas viremias (Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1983; Hamdy y Dardiri, 1984). También puede contribuir a la hipergammaglobulinemia el mantenimiento de antígenos en células presentadoras durante largos períodos de tiempo (Carrillo *et al*, 1994).

La coexistencia de viremias prolongadas junto con anticuerpos circulantes implica la formación de inmunocomplejos circulantes (Viñuela, 1985; Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1986), que van a depositarse en diferentes zonas del organismo, y fundamentalmente en el glomérulo renal (Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981; Martín-Fdez. *et al*, 1991) lo cual puede producir alteraciones a nivel de los mecanismos de filtración glomerular y otras inmunopatologías (Maxie, 1993). Por otra parte, el descenso de las proteínas del complemento observado durante la infección puede ser debido a la presencia de inmunocomplejos circulantes, que tras depositarse en el glomérulo renal forzarían el depósito de fracciones del complemento (Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981).

Durante la infección se han descrito respuestas de hipersensibilidad retardada en cerdos infectados con aislados atenuados del virus de la PPA hacia los 20 días postinfección (Shimizu *et al*, 1977). Esta respuesta podría estar en relación con la aparición de algunas lesiones orgánicas como la observada en

pulmones de cerdos infectados de forma crónica (Moulton *et al*, 1975; Pan *et al*, 1975; Shimizu *et al*, 1977).

En animales infectados con diferentes aislados del VPPA se ha detectado la existencia de anticuerpos precipitantes (De Boer, 1962; De Boer *et al*, 1972), fijadores de complemento (Cowan, 1961) e inhibidores de la hemadsorción (Malmquist, 1963). Últimamente se han detectado anticuerpos con actividad neutralizante, durante mucho considerados inexistentes en esta infección vírica (Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1986a; Zsak *et al*, 1993; Gómez, comunicación personal). También ha sido descrita la existencia de una protección parcial en lechones, proporcionada por los anticuerpos procedentes del calostro de hembras supervivientes a la infección (Schlafer *et al*, 1984; 1984a). Trabajos más recientes han demostrado que inmunoglobulinas séricas de animales supervivientes de la enfermedad son capaces de proteger frente a la infección letal, tras su transferencia a otros animales, aunque de momento no se ha descubierto el mecanismo que media este efecto protector (Wardley y Wilkinson, 1985; Zsak *et al*, 1993; Onisk *et al*, 1994).

Los anticuerpos desarrollados frente a la proteína vírica p73 han demostrado poseer actividad neutralizante, aún permaneciendo cierta fracción de virus no neutralizada (1-15%) (Zsak *et al*, 1993; Gómez, comunicación personal). Las explicaciones que se han dado para la existencia de esta fracción son variadas, pudiendo contribuir a los fenómenos de persistencia manifestados en esta enfermedad vírica (Black y Brown, 1976; García-Barreno *et al*, 1986; Zsak *et al*, 1993; Onisk *et al*, 1994).

Algunos aislados del virus han podido ser neutralizados por sueros hiperinmunes inducidos por aislados diferentes, lo cual implica la conservación de algún epítipo neutralizable (Zsak *et al*, 1993; Gómez, comunicación personal). La actividad neutralizante ha sido efectiva tanto en cultivos de células Vero como en cultivos de macrófagos, pudiendo contribuir a la protección *in vivo* (Zsak *et al*, 1993; Onisk *et al*, 1994).

Ciertos cambios conformacionales detectados en la proteína p73 durante la

adaptación del virus a cultivos celulares pudieran transformar la proteína de una conformación neutralizable a no neutralizable, explicando la ausencia de anticuerpos neutralizantes frente a aislados adaptados a cultivos (Zsak *et al*, 1993).

El fenómeno de la protección frente a virus virulento en los animales que habían sobrevivido a la infección con el homólogo atenuado es un proceso bien caracterizado para algunos aislados, lo que demuestra que es posible inducir la protección frente al virus (Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1986a). Incluso en algunos ensayos se consiguió la protección frente a virus heterólogos virulentos tras resistir la infección a dos cepas diferentes de virus atenuado (Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1983).

La gran complejidad estructural del virus, con un elevado número de proteínas inducidas y sintetizadas durante la infección, el desconocimiento de los mecanismos inmunológicos que median esa protección, así como la gran variabilidad genética y antigénica del virus dificultan en exceso el desarrollo vacunal adecuado para la enfermedad (Wesley y Tuthill, 1984; Blasco *et al*, 1989; Agüero *et al*, 1990).

La caracterización de los fenómenos neutralizantes y de la protección inducida por sueros hiperinmunes, junto al gran desarrollo de estudios moleculares con el genoma vírico, apuntan hacia el próximo descubrimiento de una vacuna efectiva frente a esta enfermedad (Zsak *et al*, 1993; Gómez y Escribano, comunicación personal).

3.C.-Alteraciones de la hemostasia.-

Las alteraciones de la hemostasia constituyen uno de los procesos con mayor trascendencia en el devenir de la infección, con el desarrollo de hemorragias y edemas generalizados como uno de los cuadros más representativos de la enfermedad, y se desarrollan como consecuencia de alteraciones producidas en

los mecanismos de coagulación y fibrinólisis (Edwards *et al*, 1985, 1985a; Genovesi *et al*, 1988; Villeda *et al*, 1993; 1993a).

El daño endotelial y tisular son dos de los principales fenómenos que inducen una activación anormal del sistema de coagulación, llevando a la producción generalizada de trombos intravasculares, que afectan fundamentalmente a la microcirculación (Robinson y Maxie, 1993). Este proceso se conoce como coagulación intravascular diseminada (CID), y conlleva un consumo masivo de factores de coagulación, a la vez que se produce una activación de la fibrinólisis, que finalmente desemboca en la aparición de hemorragias (Robinson y Maxie, 1993). Las manifestaciones clínicas más frecuentes en este fenómeno son el fallo orgánico generalizado (shock), hemorragias y hemólisis (Villeda *et al*, 1993a).

Durante la infección por el VPPA se han implicado diversos factores en la inducción de la CID. Una teoría es el virus provoca un aumento de la expresión de tromboplastina en la membrana de los macrófagos produciendo una activación de la vía extrínseca y un consumo temprano de los factores que intervienen en esta vía de la coagulación (Villeda *et al*, 1993; 1993a). También ha podido comprobarse un aumento en la producción y liberación de PGE₂ por los macrófagos, factor que induce la agregación plaquetaria y aumenta la tendencia al edema (Anderson *et al*, 1987).

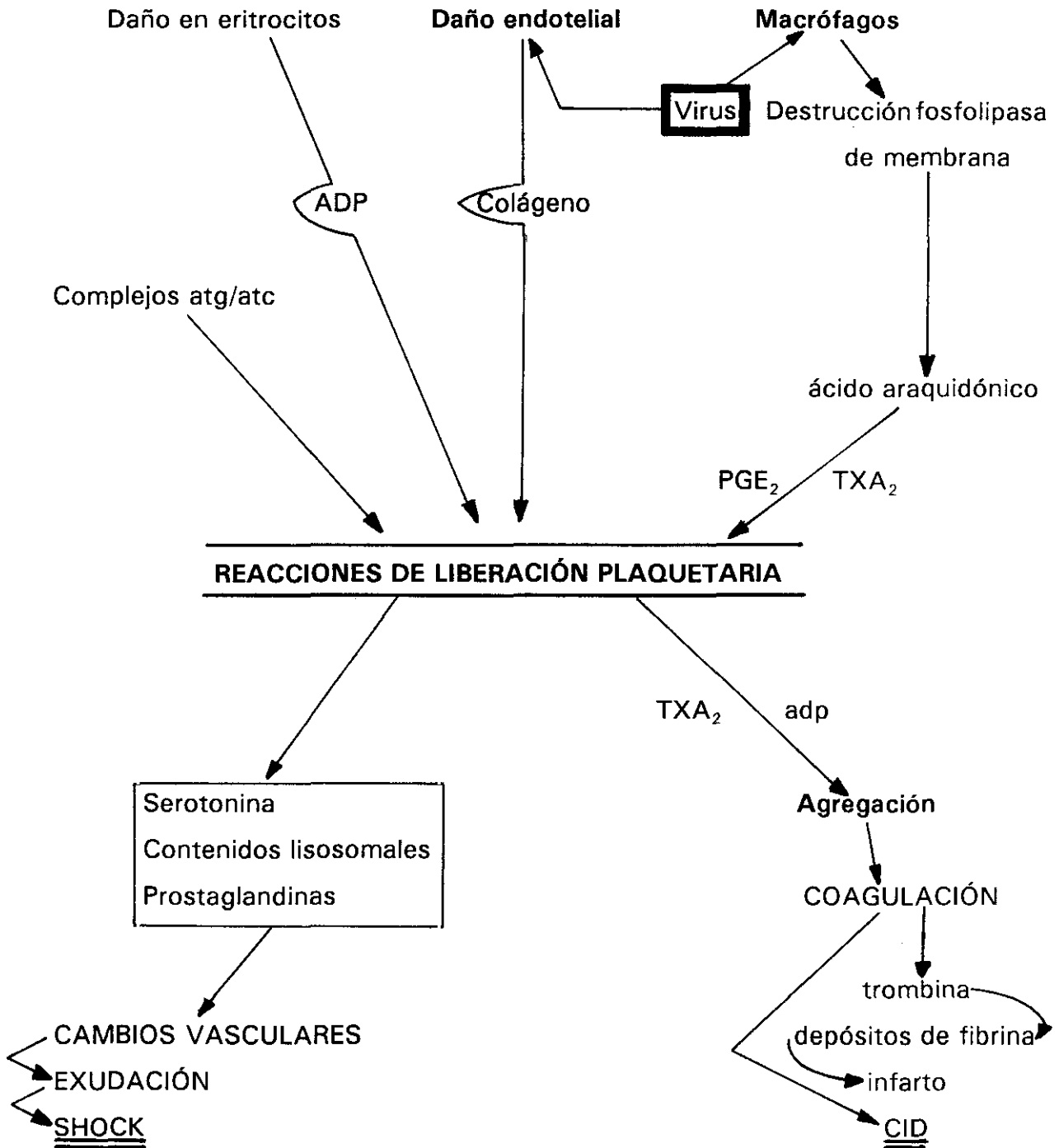
En peste porcina africana también ha habido autores que han señalado el daño tisular y las alteraciones en los vasos sanguíneos como promotores de la CID (Wardley y Wilkinson, 1985; Pan, 1987; Gómez-Villamandos *et al*, 1994, comunicación personal), aunque existe bastante controversia en cuanto a su posible implicación en este síndrome (Edwards *et al*, 1985; Anderson *et al*, 1987). Los daños en el endotelio vascular podrían ser debidos a la acción directa del virus o bien a la actuación de mecanismos autoinmunes, pero estas circunstancias no han podido ser aún demostradas (Wardley y Wilkinson, 1985).

Durante la infección se ha detectado la existencia de trombocitopenia, prolongación del tiempo de activación parcial de tromboplastina, del tiempo de protrombina, y del tiempo de coagulación de trombina, junto a una disminución del fibrinógeno y del plasminógeno sanguíneo (Edwards *et al*, 1985; 1985a; Genovesi *et al*, 1988; Villeda *et al*, 1993; 1993a); fenómenos todos ellos indicativos de la existencia de graves alteraciones en el control de la hemostasia.

Mediante diversas técnicas histológicas se ha observado la presencia de trombos en la microcirculación de órganos como riñón, pulmón, bazo, hígado y sistema nervioso central, entre otros (Moulton y Coggins, 1968; Konno *et al*, 1972; Mínguez *et al*, 1988; Martín-Fdez. *et al*, 1991), así como mediante microscopía electrónica en capilares intersticiales del riñón (Gómez-Villamandos *et al*, 1994, comunicación personal).

La patogenia de la CID durante la PPA presenta similitudes importantes con la que se produce en el transcurso de otras enfermedades como las fiebres víricas hemorrágicas del hombre y la fiebre del Valle del Rift. En todas ellas la severidad de la enfermedad está en relación con la gravedad de la CID desarrollada durante la misma (Villeda *et al*, 1993).

PESTE PORCINA AFRICANA. PATOGÉNESIS DEL SHOCK Y LA HEMORRAGIA



4.- PATOLOGÍA

4.A.-Síntomas clínicos.-

El desarrollo clínico de la enfermedad depende de la vía de entrada del virus, del aislado implicado en el proceso y del estado inmunológico de los animales, siendo más frecuentes los procesos agudos o sobreagudos en zonas vírgenes de la enfermedad y predominando los casos crónicos en zonas endémicas (Sánchez Botija, 1982).

En las formas sobreagudas se observa una mortalidad de cerdos cercana al 100%, tras un episodio de fiebre elevada y algún otro síntoma poco constante (Montgomery, 1921; Wardley *et al*, 1983).

Las formas agudas y subagudas se caracterizan por la aparición de fiebre elevada durante 2 a 5 días con anorexia, tetania y defectos de locomoción (Wardley *et al*, 1983). Aparecen luego trastornos circulatorios que se manifiestan como eritemas cutáneos; y alteraciones respiratorias y digestivas, con una diarrea hemorrágica profusa o alteraciones del sistema nervioso (Moulton y Coggins, 1968; Castagnoli, 1969).

En explotaciones de hembras reproductoras pueden observarse abortos como primera manifestación de la enfermedad (Sánchez Botija, 1982).

La muerte sobreviene entre los 6 y 9 días y se debe generalmente a una insuficiencia circulatoria y fallo cardíaco (Sánchez-Botija, 1982 ; Villeda *et al*, 1993a).

Las infecciones de tipo crónico presentan cuadros más variables. Es frecuente sintomatología general con debilidad y adelgazamiento progresivo (Coggins *et al*, 1968; Hess, 1981), fiebre intermitente (Konno *et al*, 1972; Hamdy y Dardiri, 1984), síntomas respiratorios con tos y disnea (Moulton *et al*, 1975; Pan *et al*, 1975); artritis severas (Mebus *et al*, 1981; Sánchez Botija, 1982) y lesiones en piel en forma de úlceras y focos necróticos (Hess, 1981; Sánchez Botija, 1982).

Estos animales pueden sobrevivir a la infección y quedar como portadores, pero la mayoría mueren tras una reactivación hacia formas agudas o como consecuencia de las lesiones desarrolladas (Moulton *et al*, 1975; Sánchez Botija, 1982).

Las formas subclínicas o portadores inaparentes son de mayor relevancia en el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad. Animales recuperados de formas agudas o subagudas, que sólo desarrollan lesiones discretas de la enfermedad pero que mantienen el virus, pueden actuar como transmisores tras reactivaciones de la enfermedad en las que puede aislarse virus de sangre (Sánchez-Botija y Ordás, 1980).

4.B.- Anatomía Patológica.-

4.B.1.- Macroscopía.-

Dependiendo del tipo de aislado causante del proceso y de las formas clínicas que desarrolle, se pueden observar una gran variedad de lesiones caracterizadas, de forma general, por la presencia de procesos inflamatorios exudativos, con hemorragias profusas en las formas agudas, mientras que en formas crónicas predominan los procesos inflamatorios de tipo proliferativo (Moulton y Coggins, 1968).

En las formas agudas puede aparecer una marcada esplenomegalia congestiva, hemorragias de diverso grado y aumento de tamaño en ganglios linfáticos principalmente los hepatogástricos, renales y mesentéricos (Moulton y Coggins, 1968; Castagnoli, 1969; Konno *et al*, 1969; Robinson y Maxie, 1993). Los riñones pueden presentar hemorragias petequiales en cortical renal y hemorragias profusas en pelvis (Moulton y Coggins, 1968; Pan, 1987). De forma menos constante aparecen hemorragias e hiperemias cutáneas (Moulton y Coggins, 1968), hepatomegalia con hiperemia, edema de pared en vesícula biliar con

presencia de coágulos en la bilis (Montgomery, 1921; Robinson y Maxie, 1993), edemas orgánicos generalizados (ascitis, hidropericardias, edema pulmonar, hidrotórax) y petequias o equimosis en otros órganos como corazón, intestino y serosas (Moulton y Coggins, 1968; Konno *et al*, 1969). En el sistema nervioso central puede observarse congestión meníngea y de plexos coroideos (Moulton y Coggins, 1968).

Las alteraciones cutáneas ya mencionadas se manifiestan principalmente como hiperemia, cianosis e incluso necrosis por falta de riego, principalmente en la punta de las orejas, punta del rabo y extremidades (Castagnoli, 1969).

Las lesiones más características en las formas crónicas son: linfadenomegalias, siendo éstas más evidentes en los ganglios regionales de cabeza y tórax, con hemorragias y edema subcapsulares o difusos; esplenomegalia causada por la hiperplasia de componentes celulares (Moulton y Coggins, 1968; Mínguez *et al*, 1988); neumonías con áreas de consolidación pulmonar, que pueden progresar hacia necrosis, y que es la causa principal de muerte en casos crónicos (Moulton *et al*, 1975; Robinson y Maxie, 1993); pleuritis y pericarditis fibrinosa (Moulton y Coggins, 1968; Robinson y Maxie, 1993). Con frecuencia se observan también placas de necrosis cutánea, artritis, hemorragias múltiples y hepatomegalia (Moulton y Coggins, 1968).

4.B.2.- Microscopía.-

En las formas agudas, la característica más destacable de las lesiones microscópicas es la presencia de necrosis con cariorrexis y deplección linfóide en los diferentes órganos (Moulton y Coggins, 1968). Además son marcadas las alteraciones vasculares con hialinización y necrosis fibrinoide, y aparición de hemorragias y edemas (Moulton y Coggins, 1968; Mebus *et al*, 1981; Villeda *et al*, 1993a).

Por órganos podemos encontrar adenomegalias con marcada deplección linfóide, abundantes restos celulares y hemorragias de diferente grado (Mebus *et*

al, 1981; Mínguez *et al*, 1988) neumonía intersticial con edemas alveolar e intersticial, descamación celular y presencia de macrófagos en la luz (Moulton y Coggins, 1968; Arias *et al*, 1986); infarto hemorrágico en bazo con marcada deplección linfóide por necrosis y restos celulares abundantes en pulpa roja (Konno *et al*, 1972; González-Juarrero *et al*, 1992); hepatitis serosa con focos de necrosis intralobulillar, situándose el infiltrado mononuclear en espacios porta y tabiques perilobulillares (Mebus *et al*, 1981; Sierra *et al*, 1987); hemorragias en intersticio renal con tubulonefrosis y microtrombos glomerulares (Colgrove *et al*, 1969; Quezada *et al*, 1989; Martín-Fdez. *et al*, 1991); enteritis linfoplasmocitaria con frecuentes hemorragias fundamentalmente en colon (Moulton y Coggins, 1968; Robinson y Maxie, 1993); en el sistema nervioso central se observa meningoencefalitis con manguitos linfoides perivascuales (Moulton y Coggins, 1968; Mebus *et al*, 1981; Arias *et al*, 1986).

En las formas crónicas de la infección predominan los procesos proliferativos, desapareciendo los fenómenos típicos de necrosis celular (Moulton y Coggins, 1968; González-Juarrero *et al*, 1992).

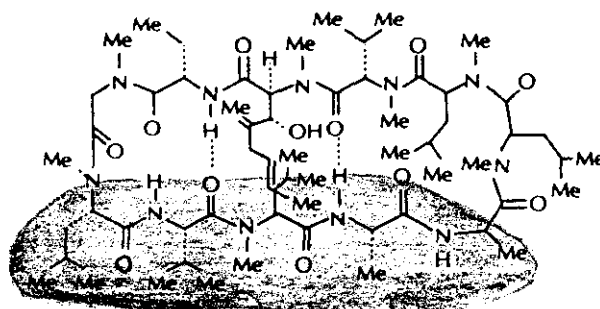
La alteración orgánica más evidente se presenta en ganglios, que aparecen con aumentos evidentes de su tamaño normal debido a la proliferación de linfocitos en centros germinales y a los abundantes macrófagos presentes en áreas subcapsulares y medulares (Moulton y Coggins, 1968; Mínguez *et al*, 1988); los pulmones suelen presentar una intensa neumonía intersticial, junto a edema alvéolo-intersticial y exudado fibrinoso en alvéolos y sobre la pleura. En ocasiones aparecen complicaciones necróticas con delimitación celular y fibrosa (Moulton *et al*, 1975); en el bazo se descubre una hiperplasia de células reticulares y de las células del SMF, y a veces atrofia de folículos linfoides (Konno *et al*, 1972; Mínguez *et al*, 1988; González-Juarrero *et al*, 1992); en riñones la lesión principal es aparición de glomerulonefritis mesangio-proliferativa, con depósitos de las membranas basales glomerulares (Mebus *et al*, 1981; Quezada *et al*, 1988; Martín-Fdez. *et al*, 1991); en el sistema nervioso central las lesiones son similares al proceso agudo (Moulton y Coggins, 1968).

FARMACOLOGÍA DEL SISTEMA INMUNE

El gran desarrollo que han sufrido las técnicas de trasplante durante la última década, así como el descubrimiento de innumerables enfermedades de origen autoinmune, ha llevado unido el estudio intensivo de nuevos productos farmacológicos que redujeran o paliaran los efectos deletéreos de una respuesta inmune inadecuada o de un rechazo del trasplante no deseado (Gallagher *et al*, 1993).

Algunos de los fármacos con mayor futuro en estos momentos basan su mecanismo de acción en la interacción con vías celulares intrínsecas de activación. Entre esos fármacos se encuentra la Ciclosporina A (CsA), un undecapéptido de estructura cerrada (Fig. 1) con un peso molecular de 12 kDa, que posee un aminoácido específico, y muchos hidrofóbicos lo que le hace insoluble en agua y soluble en lípidos o solventes orgánicos (Morris, 1981; Liu, 1993). Este fármaco se extrajo de algunos microorganismos existentes en el suelo en Noruega, como *Trichoderma polysporum* Rifai, *Cylindrocarpum lucidum* o *Tolypocladium inflatum*, a mediados de los años 70 (Borel *et al*, 1976).

(a) CsA



Estructura de la ciclosporina A. En sombreado aparece el lugar activo (Liu, 1993).

Su actividad principal sobre la activación de células T ha sido objeto de numerosos estudios que han permitido el acercamiento hacia los procesos intrínsecos implicados en la transmisión de información desde el exterior celular hasta el núcleo.

1.-Actividad de la CsA sobre el sistema inmune

Los primeros estudios sobre la actividad de la CsA señalaban las propiedades antilinfocíticas del fármaco, tanto en respuestas celulares primarias y secundarias como en respuestas humorales (Borel *et al*, 1976; 1977).

Más tarde comenzaron a descubrirse los procesos mediante los cuales puede actuar la CsA, sobre todo a través de la inhibición de la liberación de la IL-2 en células T colaboradoras activadas (Bunjes *et al*, 1981; Sigal y Dumont, 1992). Su efecto además resultaba ser reversible *in vitro* en cultivos de linfocitos, tras realizar un lavado y reestimulación de los mismos, hecho que excluía un posible efecto citotóxico del compuesto (Morris, 1981).

El efecto inmunosupresor de la CsA se ejerce principalmente a través de una interferencia con la función normal de los linfocitos T, al inhibir las vías tempranas de transmisión de señales que llevan a la activación de los genes de algunas linfoquinas como la IL-3, IL-4, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF (Quesniaux, 1993; Crabtree y Clipstone, 1994), pero parece más importante la inhibición de las vías de activación de los genes de la IL-2 (Konke *et al*, 1984; Emmel *et al*, 1989; O'Keefe *et al*, 1992).

La ciclosporina A actúa fundamentalmente en vías que requieren un aumento del Ca^{2+} intracelular, y en las vías de activación celular tras la unión del receptor de linfocitos T con el CD3 (Sigal *et al*, 1991; Sigal y Dumont, 1992). No se ha detectado inhibición de otras vías de activación de linfocitos como la proliferación dependiente de IL-2 o la activación vía CD28 (June *et al*, 1987).

Por otra parte se ha demostrado el efecto inhibidor de la CsA sobre otros genes no relacionados con las linfoquinas como el *c-myc* (Granelli-Piperno *et al*, 1986), genes de la familia *src* (Furue *et al*, 1993) o incluso el aumento de expresión de otros genes (Sigal y Dumont, 1992).

2.-Efectos sobre la funcionalidad celular

Además de producir la inhibición de las respuestas T dependientes (Sigal y Dumont, 1992; Bierer *et al*, 1993) el tratamiento con CsA puede impedir la degranulación de linfocitos T citotóxicos activados por diferentes vías (Trenn *et al*, 1989); la degranulación de basófilos y mastocitos (Cirillo *et al*, 1990) y la de neutrófilos (Sigal y Dumont, 1992).

Según algunos autores, la activación de linfocitos B dependiente de células T también queda inhibida por el efecto celular de la CsA (Wicker *et al*, 1990) así como otras vías directas de activación de los linfocitos B (Klaus, 1988; Wicker *et al*, 1990).

Por el contrario también se ha descrito la activación de linfocitos B en respuesta a diferentes antígenos y en presencia de CsA (Klaus, 1988; Wicker *et al*, 1990).

En linfocitos T, las vías que llevan a la aparición de fenómenos de apoptosis y que son dependientes del Ca^{2+} resultan inhibidas tras el tratamiento con CsA (Shi *et al*, 1989; Sigal y Dumont, 1992; Crabtree y Clipstone, 1994) mientras que en linfocitos B se ha observado que el tratamiento a bajas dosis con CsA induce la muerte celular tras su activación (Wicker *et al*, 1990).

Diversos estudios han señalado la existencia de interferencias con la presentación antigénica a dosis mayores de las necesarias para inhibir la producción de linfoquinas (Little *et al*, 1990), aunque es posible que sus efectos sean mayores a través de la supresión de la secreción de las linfoquinas, las cuales inducen la

maduración y la expresión de moléculas del MHC en células presentadoras de antígeno (Sigal y Dumont, 1992).

En modelos de respuesta a antígenos víricos se ha señalado que la CsA es capaz de producir una tolerancia antígeno-específica frente a virus que desarrollan persistencia en el hospedador, protegiendo además del efecto letal que desarrollan los linfocitos CD8⁺ en respuesta al virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)(Stitz, 1992).

En otros modelos experimentales se ha podido observar que la droga produce una inmunomodulación, al cambiar el tipo de respuesta inmunológica desarrollada durante la infección de celular a humoral y viceversa según las condiciones de estimulación antigénica (Brestcher y Havele, 1992).

3.-Bioquímica de la actividad de la CsA

Muchos han sido los trabajos realizados con la finalidad de descubrir los mecanismos intracelulares implicados en la inmunosupresión mediada por la CsA. Existe una familia de proteínas intracitoplásmicas con actividad isomerasa, denominadas ciclofilinas (Walsh *et al*, 1992) a las cuales se une la CsA formando un complejo capaz de asociarse a la fosfatasa calcineurina (Bierer *et al*, 1990; Sigal y Dumont, 1992; Bierer *et al*, 1993; Crabtree y Clipstone, 1994). Esta enzima es activada por la calmodulina en presencia de Ca²⁺, lo que podría explicar el requerimiento de este ión en las vías sensibles a la CsA tras la formación del complejo ciclofilina-CsA-calcineurina (Liu J. *et al*, 1992; O'Keefe *et al*, 1992; Crabtree y Clipstone, 1994).

La calcineurina es un intermediario esencial en la inducción de apoptosis (Fruman *et al*, 1992) y en la degranulación de linfocitos T citotóxicos (Dutz *et al*, 1993) por lo que la inhibición de su actividad fosfatasa plantea graves consecuencias para la actividad normal de algunas células (Fruman *et al*, 1992; 1992a).

Estudios llevados a cabo en la región promotora del gen de la IL-2 demostraron que la CsA es capaz de afectar a algunos elementos estimulantes del gen, sobre todo al factor nuclear de células T activadas (NF-AT) (Flanagan *et al*, 1991; McCaffrey *et al*, 1993; Crabtree y Clipstone, 1994). El NF-AT presenta un componente citoplásmico que pasa al núcleo mediante mecanismos Ca^{2+} dependientes, tras ser defosforilado por la calcineurina (Flanagan *et al*, 1991; Moll *et al*, 1991; Clipstone y Crabtree, 1992; Jain *et al*, 1992; McCaffrey *et al*, 1993). Este proceso indica una clara conexión entre la inhibición de la IL-2 y la unión de la CsA a la calcineurina celular, ya que se impediría la defosforilación del NF-AT citoplásmico y por lo tanto no podría transmitir las señales de activación al núcleo (Clipstone y Crabtree, 1992, Crabtree y Clipstone, 1994).

4.-Efectos orgánicos

El tratamiento con CsA produce alteraciones en la maduración de timocitos y en la selección fenotípica realizada en este órgano (Kosaka *et al*, 1990) tras lo cual aparecen linfocitos T fenotípicamente inmaduros en ganglios y otros órganos linfoides periféricos (Chen-Woan y Goldschneider, 1991). El hecho de que no exista selección fenotípica en el timo, implica la aparición de células reactivas frente a antígenos propios, aunque no se ha observado el desarrollo de procesos autoinmunes letales tras el tratamiento con CsA (Urdahl *et al*, 1992).

Se han podido observar, además, reducciones en el tamaño y la celularidad de la médula del timo (Morris, 1981) así como una involución en la estructura de la misma, con una disminución de la expresión de MHC-II y pérdida de corpúsculos de Hassal y de células dendríticas, interdigitadas y epiteliales (Morris, 1981; Beschomer *et al*, 1987; Kanariou *et al*, 1989).

En el bazo se puede encontrar una reducción de la zona marginal y de la vaina periarteriolar, compartimentos que contienen líneas T citotóxicas y colaboradoras (Morris, 1981).

En médula ósea, la CsA puede inducir la producción de células citotóxicas

naturales (NK), ya que se observa un aumento de esta población celular en el bazo durante el tratamiento con CsA (Kosugi y Shearer, 1991).

5.-Toxicidad y efectos nocivos

La toxicidad inducida por la CsA puede dividirse en dos grupos: 1.-efectos colaterales asociados a la inhibición de la respuesta inmune (fundamentalmente infecciones secundarias); 2.- toxicidad en otros órganos o sistemas (Sigal y Dumont, 1992).

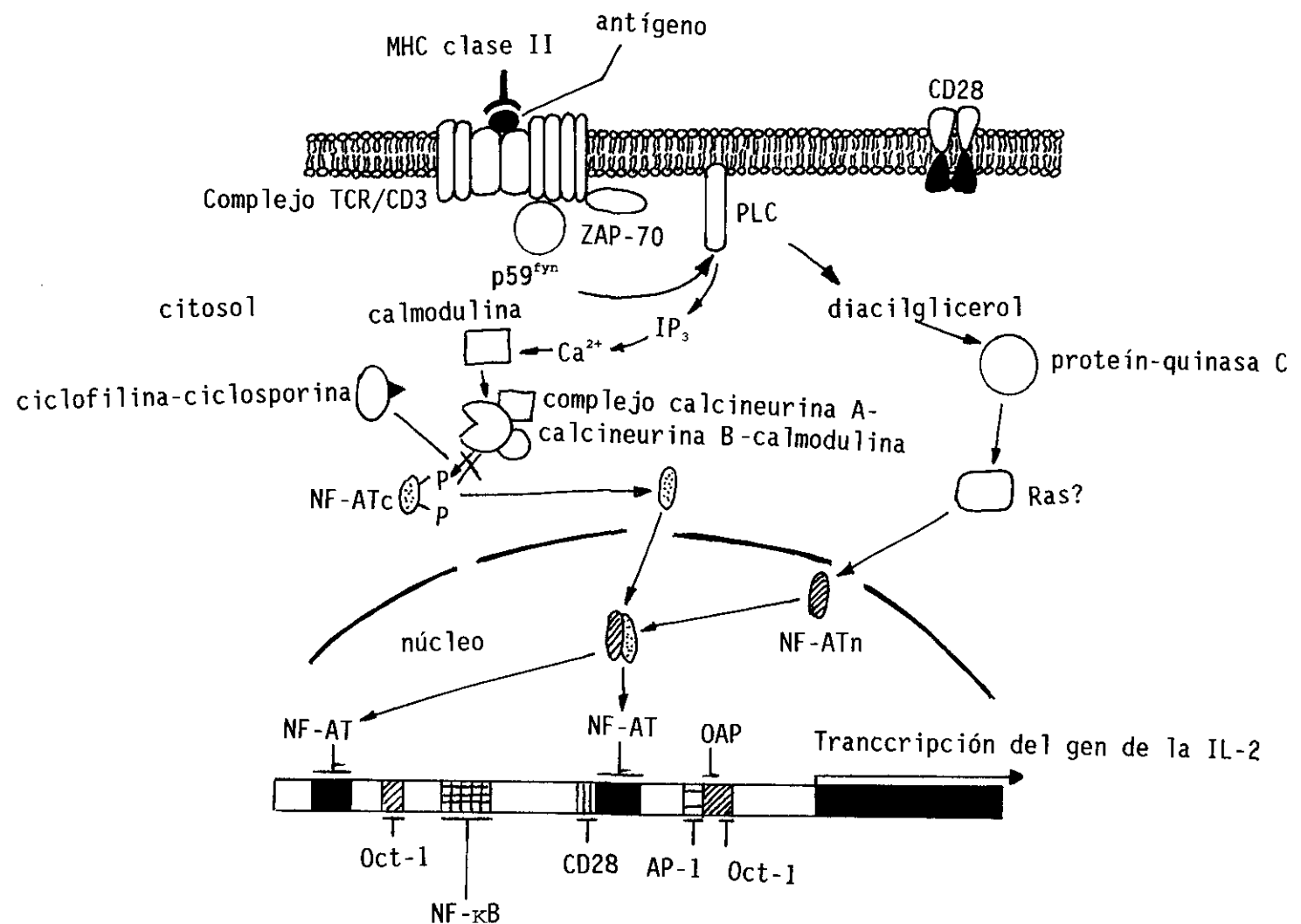
Posiblemente el mayor daño hasta ahora observado es la nefrotoxicidad, que se manifiesta en una disminución de los índices normales de filtración glomerular, asociado con una disminución en la circulación de sangre renal por un aumento de la resistencia vascular (Mason, 1989; Fergusson *et al*, 1993).

Diversos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* para caracterizar el efecto de la CsA sobre el músculo liso vascular indican que existe una reducción de la hiperplasia muscular inducida tras provocar daños mecánicos en el endotelio que pudiera ser mediada por la inhibición de la actividad de linfocitos T (Jonasson *et al*, 1988; Saenz *et al*, 1991), o por la modulación de la secreción endotelial (Leszczynsky *et al*, 1993).

La aparente paradoja que representa el hecho de que la CsA induzca inmunosupresión a la vez que parece desarrollar ciertas formas de autoinmunidad puede quedar explicada por la existencia de células T autorreactivas periféricas, que se activarían al suspender la inmunosupresión (Cheney y Sprent, 1985; Jones *et al*, 1989; Bryson *et al*, 1991).

La aparición de fenómenos autoinmunes puede ser debida a un efecto profundo en el desarrollo de células T y en la selección del repertorio antigénico en el timo, evitando la desaparición de células autorreactivas y la aparición de células

T reguladoras (Prud'homme *et al*, 1991). Las células efectoras del proceso autoinmune podrían ser células T que han escapado a la selección negativa y expresan receptores de linfocitos T prohibidos o bien células T autorreactivas que existen de forma normal y que han escapado al control inmunitario de otras células (Cheney y Sprent, 1985; Prud'homme *et al*, 1991).



Vías de transducción para la transcripción del gen de la IL-2 (Liu, 1993).

INTERACCIÓN DE LOS VIRUS CON EL SISTEMA INMUNE

1.- INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDA POR VIRUS

El sistema inmunitario de los seres vivos puede sufrir alteraciones en su funcionalidad o destrucción de alguno de sus componentes, como resultado de las infecciones producidas por virus, entre otros agentes patógenos (Tizard, 1992).

La replicación de los viriones en el interior de células del sistema inmune o la alteración de algunos sistemas orgánicos de defensa son estrategias de interacción muy habituales entre un virus y su hospedador, pudiendo actuar como células diana diferentes poblaciones de células (McChesney y Oldstone, 1987).

Los fenómenos que pueden llevar a un inmunosupresión total o parcial son variados. Hasta el momento, en PPA se ha demostrado la existencia de lisis de células de la respuesta inmune por la acción directa del virus (Wardley y Wilkinson, 1977) y la inducción de factores solubles inmunosupresores (Passaquala *et al*, 1988; González *et al*, 1990). Otros mecanismos frecuentes en infecciones víricas son la activación de los procesos de muerte celular programada (Laurent-Crawford *et al*, 1991; Groux *et al*, 1992; Saha *et al*, 1994); la acción directa del virus sobre células precursoras (Folks *et al*, 1988); la infección preferencial de células memoria (Schittman *et al*, 1990); la interferencia con señales normales de transducción hacia el interior celular (Levy, 1993); destrucción de células no infectadas que presentan en su membrana proteínas víricas (Lanzavecchia *et al*, 1988; Weinhold *et al*, 1988); la destrucción de células no infectadas por linfocitos citotóxicos (Weinhold *et al*, 1988; Zarling *et al*, 1990; Shearer y Clerici, 1991); la presencia de autoanticuerpos frente a linfocitos (Chams *et al*, 1988; Thiriart *et al*, 1988)... Hoy en día se desconoce si algunos de ellos pueden tener un papel en la patogenia de la PPA.

Entre los sistemas utilizados para la diseminación orgánica de las partículas víricas, uno de los más efectivos es la infección de células del sistema mononuclear fagocitario (SMF), como ocurre en la PPA (Casal *et al*, 1984). La infección de estos elementos de alta capacidad migratoria y difusión orgánica permite a los virus evitar el ataque de otros sistemas defensivos (Esser *et al*, 1991; Oldstone, 1991). Además es una población implicada en la aparición de hospedadores persistentemente infectados (Kauffman y Fields, 1985; Oldstone, 1991; Salvato *et al*, 1991; Esolen *et al*, 1993; Carrillo *et al*, 1994).

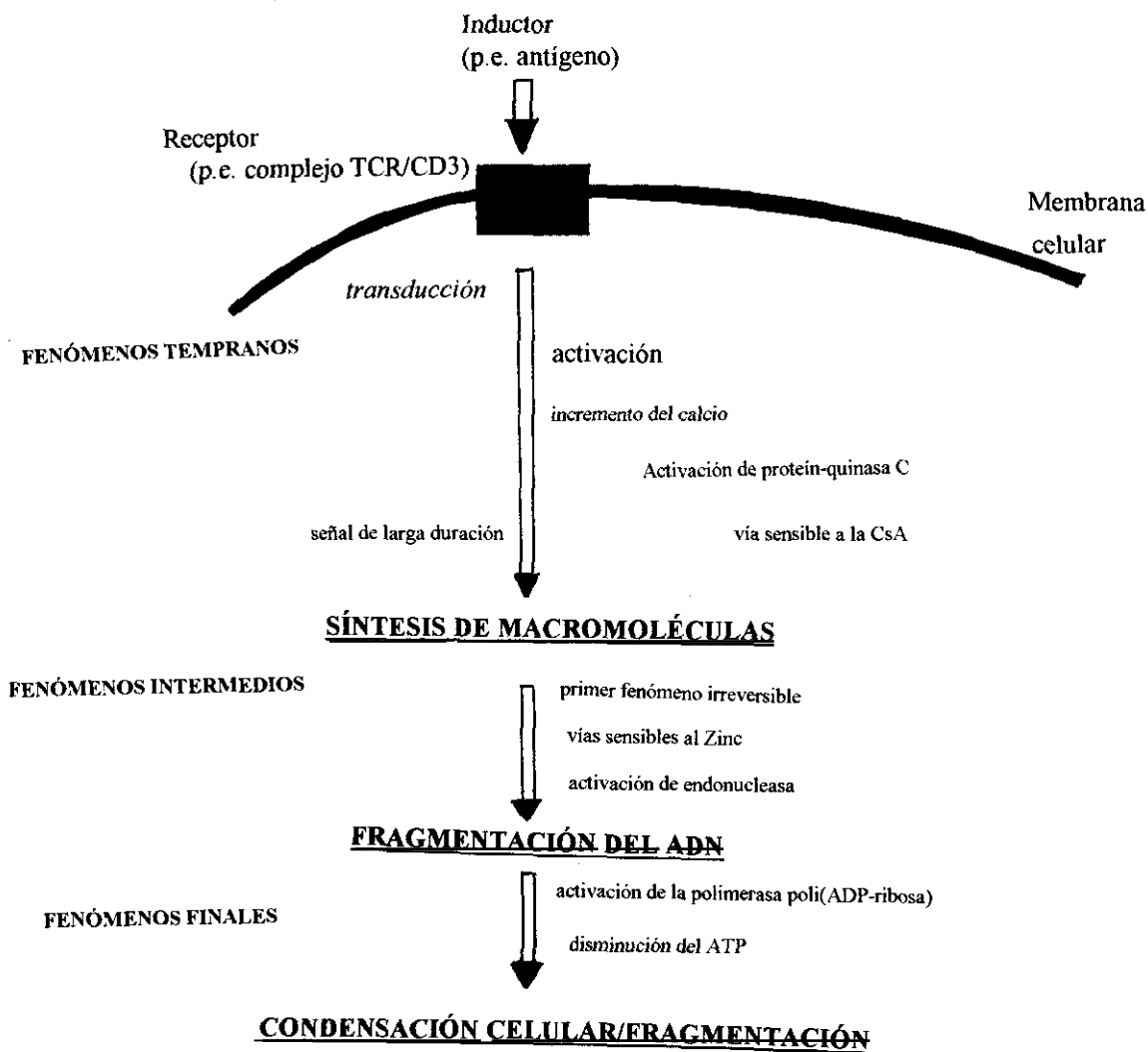
Por último, otros mecanismos inmunosupresores pueden ser la activación por parte del virus de células supresoras que aparecen en diferentes poblaciones leucocitarias (Rouse y Horohov, 1986; Tizard, 1992); o la secreción de algunas citoquinas con carácter inhibitorio como el IFN (De Maeyer *et al*, 1975; Johnson *et al*, 1975; Sonnenfeld *et al*, 1977; Aune y Pierce, 1982).

2.- APOPTOSIS

En el año 1972, Kerr *et al*, denominaron apoptosis a la muerte celular programada en el organismo, por similitud con el proceso de caída de las hojas en el otoño (Golstein *et al*, 1991; Cohen *et al*, 1992). El proceso puede desencadenarse por la acción de inductores extracelulares, que tras su unión a ciertos receptores de membrana inician los procesos metabólicos que llevan a la destrucción de la célula (Golstein *et al*, 1991; Green y Scott, 1994).

La característica principal del fenómeno es el colapso nuclear, que puede observarse como una condensación de la cromatina que tiende a marginarse en forma de medias lunas o esferas en la membrana nuclear. Este proceso finaliza con la fragmentación celular en cuerpos apoptóticos rodeados de membrana plasmática. La integridad de la membrana hasta el final del proceso es una característica diferencial con la muerte celular por necrosis en que se produce en sus fases iniciales (Cohen *et al*, 1992).

Tras la activación de endonucleasas se produce la fragmentación del ADN nuclear en las uniones internucleosomales, dando lugar a unidades de 180-200 pares de bases, llamadas nucleosomas. Cada nucleosomas está formado por un segmento de ADN asociado con proteínas histonas (Golstein *et al*, 1991; Green y Scott, 1994). En la muerte celular por apoptosis se observan otros cambios morfológicos, como la condensación citoplásmica y procesos metabólicos como la síntesis de nuevas macromoléculas en el interior de la célula, necesarias en algunos casos para la producción de la muerte celular (Cohen y Duke, 1984; Golstein *et al*, 1991).



Vías intracelulares de progresión del fenómeno de apoptosis (Golstein *et al*, 1991).

El proceso de apoptosis tiene un papel fundamental en la maduración y en la regulación de la actividad funcional del sistema inmune (Raff, 1992). Durante la maduración de los timocitos, se eliminan por apoptosis los clones celulares autorreactivos, tras el reconocimiento de antígenos propios. Esto se realiza de forma que la activación de linfocitos inmaduros a través del receptor de linfocitos T induce el desarrollo de apoptosis antes que su activación. Es decir, los mismos fenómenos que llevan a la activación de las células pueden provocar la muerte celular, siendo la producción de apoptosis un sistema de inducción de tolerancia (Dent *et al*, 1990; Russel *et al*, 1991; Green y Scott, 1994).

Además de la delección clonal, otra posible función de la apoptosis inducida tras activación celular puede ser reestablecer la respuesta inmune tras una intensa reacción defensiva o la pérdida de ciertos clones de linfocitos memoria (Green y Scott, 1994; Salmon *et al*, 1994).

También han sido observados fenómenos de apoptosis en linfocitos B, principalmente gracias al uso de animales transgénicos (Cohen *et al*, 1992; Carsetti *et al*, 1993) o en cultivos de líneas celulares (Fluckiger *et al*, 1994).

Se han propuesto dos modelos para explicar la aparente paradoja que representa el hecho de que las mismas señales que llevan a la activación de algunas células, puedan inducir apoptosis en otras (Green y Scott, 1994). La primera posibilidad es que las células que sufren apoptosis tras su activación hayan recibido alguna señal mortal previa que no reciben las células que proliferan (Iseki *et al*, 1991; Liu *et al*, 1994); la segunda posibilidad es que la activación induzca una señal que puede producir apoptosis en cualquier célula, pero que las células que sobreviven pueden recibir alguna otra señal adicional que impida la puesta en marcha de la muerte celular programada (Boehme y Lenardo, 1993; Buschle *et al*, 1993; Tsubata *et al*, 1993).

La importancia de la deplección de algunas poblaciones celulares mediante fenómenos de apoptosis, inducida tras la activación, queda patente en el hecho de que muchos procesos infecciosos inducidos por virus actúan induciendo estos

sistemas de muerte celular, como el virus de la inmunodeficiencia humana o el virus de la coriomeningitis linfocítica del (Ameisen y Capron, 1991; Terai *et al*, 1991; McCabe y Orrenius, 1992; Razvi y Welsh, 1993).

Día tras día parece más evidente que los procesos de apoptosis o muerte celular programada no son la excepción, sino un proceso habitual durante el desarrollo de los tejidos animales (Raff, 1992; Green y Scott, 1994; Punt *et al*, 1994; Shortman y Scollay, 1994; Surh y Sprent, 1994), así como en la respuesta celular a diversos agentes externos (King y Ashwell, 1993; Williams y Smith, 1993).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

A.- EXPERIMENTOS *IN VIVO*

1.-VIRUS

Para llevar a cabo los estudios *in vivo* de patogenia con el virus de la Peste Porcina Africana utilizamos dos modelos experimentales previamente caracterizados. Como virus atenuado seleccionamos el virus España-75, atenuado tras cuatro pases en la línea estable de riñón de mono CV₁ (ATC CCL70) (Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1966). Esta cepa es de gran importancia experimental ya que induce protección frente a la infección con el virus homólogo virulento durante períodos largos de tiempo (Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1983; 1986a). La mortalidad producida por este virus varia según la vía de inoculación, pero oscila entre un 10% y un 50% (Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1983; Pastor y Escribano, 1989; Alcaraz *et al*, 1992) y se clasifica como una cepa moderadamente virulenta y altamente infectiva.

Se inocularon por vía oral unas $10^{5.6}$ Dosis Infectivas₅₀ (DI₅₀) por animal en dos mililitros de suspensión de suero salino estéril.

Como modelo virulento seleccionamos la cepa España 70, cepa altamente infectiva y muy virulenta, que produce una mortalidad cercana al 100% en los primeros días de la infección (Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1983). Este virus fue inoculado por vía intramuscular a una dosis de 10^3 DI₅₀ por animal.

2.-ANIMALES

Un total de 30 animales entre cerdos Largewhite y minipig, tanto machos como hembras y con edades comprendidas entre los 2 y 6 meses fueron sometidos a los diferentes protocolos experimentales y agrupados según los mismos en seis bloques de trabajo:

-GRUPO I: 9 animales infectados con virus moderadamente virulento (E75CV₁-4).

-GRUPO II: 7 animales infectados con virus moderadamente virulento (E75CV₁-4) e inmunosuprimidos con ciclosporina A.

-GRUPO III: 4 animales infectados con virus moderadamente virulento (E75CV₁-4) e inmunosuprimidos a diferentes tiempos postinfección.

-GRUPO IV: 2 animales infectados con virus virulento (E70L7).

-GRUPO V: 5 animales infectados con virus virulento (E70L7) e inmunosuprimidos con ciclosporina A.

-GRUPO VI: 3 animales testigo.

El peso de los animales osciló entre los 20 y los 40 kg. Éstos fueron desparasitados con Ivermectina (Ivomec®, Merck) a la dosis recomendada, por vía subcutánea. Los animales se alojaron en jaulas de mantenimiento, con agua *ad libitum* y pienso compuesto una vez al día.

El sacrificio de los animales fue realizado entre los días 19 y 21 postinoculación mediante inoculación de una sobredosis de anestésico (Pentobarbital sódico, Eutalender®, Labs. Normón).

3.-TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR

Doce animales fueron inmunosuprimidos desde el día anterior a la inoculación del virus atenuado o virulento, mediante inoculación intravenosa diaria de

ciclosporina A (Sandimum®, Sandoz) a una dosis final entre 5-7 mg/kg p.v. Ante problemas de tipo técnico la ciclosporina A se administró por vía oral a una dosis de 15 mg/kg p.v.

La CsA, vehiculada en solución oleosa, fue diluida en suero salino estéril al 1/3 e inoculada lentamente a través de un sistema de palomilla de inyección intravenosa.

En cuatro animales se retrasó el comienzo de la inmunosupresión a los momentos de máxima viremia; en el día seis (dos animales) y doce (dos animales) postinfección.

Para disminuir el riesgo de sobreinfecciones se realizó una antibioterapia con oxitetraciclina (Oxiciven®,)

4.- EFECTO DE LA CsA SOBRE EL VIRUS DE LA PPA

Para descartar un posible efecto inhibitorio directo de la CsA sobre la replicación o actividad biológica del virus elegimos el sistema de inhibición o reducción de la formación de placas en cultivo de células Vero (Zsak *et al*, 1993; Gómez, comunicación personal).

Cultivos de células Vero en placas de 6 pocillos (3×10^5 cels/pocillo) se incubaron durante dos horas con 100 unidades formadoras de placa (UFP) de los aislados del VPPA 608VR13 o 608VR79, y se mantuvieron posteriormente en medio Dulbecco (Gibco BRL) con 0,8 de agarosa (Sigma), 5% de suero fetal bovino (BioWhitaker) y 40 µg/ml de gentamicina (Gevramicin, Schering-Plough). Tras diez días de incubación (placas visibles) se fijaron con formaldehído al 10% (4 horas), se retiró el agar y se tiñeron con cristal violeta al 1% en metanol/agua al 1/4 durante 1 hora. Finalmente se lavaron con agua y se dejaron secar.

Se utilizaron diferentes concentraciones del inmunosupresor Ciclosporina A diluido en el medio de cultivo (de 50 ng/ml a 800 ng/ml).

Las incubaciones se realizaron a 37°C en cámara de CO₂.

5.-VALORACIÓN DE SÍNTOMAS Y TOMA DE TEMPERATURA

La observación de los síntomas fue realizada diariamente, poniendo especial atención en la actividad de los animales, apetito, síntomas respiratorios, vómitos, diarrea o estreñimiento y aparición de lesiones cutáneas.

La temperatura fue obtenida diariamente por vía rectal.

6.-VALORES HEMATOLÓGICOS

Los recuentos globales de leucocitos se realizaron mediante un contador celular Coulter Counter ZM.

Los recuentos diferenciales de células se evaluaron en frotis teñidos por la técnica de Giemsa (Merck) sobre un total de 300 leucocitos en un microscopio Leitz Dialux.

7.-ANTICUERPOS DE INFECCIÓN

7.A.- Determinación del título de anticuerpos.-

La valoración del título de anticuerpos en el suero de los animales sometidos a la infección experimental se realizó mediante dos técnicas, inmunofluorescencia indirecta (IFI) y enzimoimmuno análisis (ELISA).

Para realizar la IFI se prepararon cultivos de células Vero infectadas con el VPPA (E70MS84) en portas de titulación (Nunc). Los cultivos se fijaron en acetona durante 5 minutos para su conservación.

Diluciones dobles seriadas de los sueros problema se incubaron durante 30 minutos con los cultivos infectados. Se lavaron las muestras con PBS (pH 7,2) y

se incubaron con el conjugado proteína A-fluoresceína (BioMakor) diluido al 1/100 durante 30 minutos. Finalmente se lavaron con PBS y se montaron con glicerina tamponada (Fluoprep, Rhone-Merieux). La valoración se realizó en un microscopio de fluorescencia Leitz Dialux. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C en cámara húmeda.

Para realizar la técnica de ELISA se siguió el protocolo definido por Escribano *et al* (1989). Se prepararon placas de titulación con antígeno del VPPA. Diluciones seriadas de los antisueros problema se incubaron durante una hora en los pocillos. Se lavaron las placas con PBS-Tween 20 (0,05%, Merck) y se incubaron posteriormente con proteína A-peroxidasa (Sigma) durante 1 hora. Se lavaron de nuevo con la solución de lavado y se echó el sustrato DMAB/MBTH (Sigma) con agua oxigenada, frenando la reacción con ácido sulfúrico 3N. Las incubaciones se realizaron a 37°C y la lectura se realizó en un espectrofotómetro (Titertek Multiscan®, MC) a una longitud de onda de 620 nm.

7.B.-Efectos neutralizantes de los anticuerpos.-

Para estudiar el efecto neutralizante de los anticuerpos sobre diferentes virus de PPA volvimos a utilizar el sistema de inhibición de la formación de placas en cultivo ya descrito en el apartado anterior. Se utilizaron placas de 24 pocillos a una concentración de 10^5 células Vero/pocillo. Previamente a la incubación con el virus, éstos eran mantenidos junto con diferentes diluciones de los antisueros problema durante 18 horas a 37°C, tras lo cual se infectaron los cultivos con el virus adsorbido al anticuerpo. Después de incubar durante dos horas con la mezcla de virus/antisuero, se retiró el inóculo de las placas y se depositó el medio de cultivo Dulbecco en agarosa al 0.8% con 5% de suero fetal bovino y 40 µg/ml de gentamicina. Posteriormente se valoró la reducción en la formación de placas tras la neutralización del virus respecto al control de virus incubado con suero normal porcino.

8.-DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE VIRUS EN SANGRE

Para la determinación de las viremias en los diferentes cerdos y días postinfección escogimos el método descrito por Hess y DeTray en 1961 y Malmquist y Hay en 1960.

Se realizó un macerado del coágulo sanguíneo que se diluyó en PBS estéril al 1/10 con un 10% de suero porcino y 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. Estas muestras fueron conservadas a -70°C hasta su utilización.

Preparamos cultivos de leucocitos porcinos con suero autólogo en placas de microtitulación de 96 pocillos. Por cuatuplicado, se incubaron los cultivos con diluciones decimales seriadas de las muestras problema. Tras 10 días de incubación en cámara de CO_2 a 37°C se realizó la lectura por valoración del efecto citopático en el cultivo. Con estos resultados calculamos la dosis infectiva₅₀ (DI_{50})/ml de sangre, según el método descrito por Reed y Muench (1938).

9.-CITOMETRÍA DE FLUJO

9.A.- Extracción de sangre y obtención de leucocitos.-

Las extracciones de sangre fueron entre 15 y 20 ml de la vena cava craneal o de la vena yugular.

En sangre heparinizada se separaron las células mononucleares mediante sedimentación en Dextrano (Dextran T500, Pharmacia) y gradiente de Percoll (Pharmacia) (González *et al*, 1990). Realizamos un tratamiento hipotónico final para eliminar los eritrocitos contaminantes.

Las células se resuspendieron en tampón de citometría (PBS + seroalbúmina bovina 0,1% (Sigma) + azida sódica 0,01%) a una concentración final de $10\text{--}20 \times 10^6$ células/ml.

Para la realización de pruebas *in vitro* las células se resuspendieron en medio

RPMI completo (RPMI (Gibco-BRL) + gentamicina 40 $\mu\text{g/ml}$ + penicilina 10^5 unidades/ml (Penilevel, Labs. Level) + HEPES 20 mM (Flow) + 2 mercaptoetanol 5×10^{-5} M (Merck) + L-glutamina 2 mM (Gibco BRL) + 5% suero fetal bovino).

9.B.- Marcaje simple, doble y triple marcaje fluorescente.-

Los marcajes fluorescentes se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo cónico (Flow), según el método descrito previamente (Terstappen *et al*, 1989; Loken *et al*, 1990; Alcaraz *et al*, 1992; Coligan *et al*, 1992; Padovan *et al*, 1992).

Las células ($1-2 \times 10^6$ células/pocillo) se incubaron durante 45 minutos a 4°C con el anticuerpo primario, a las diluciones especificadas en el apartado 9.C.

Como marcadores fluorescentes utilizamos utilizamos un conjugado conejo-anti-ratón F(ab)₂-FITC (Dako) para determinar la fluorescencia uno; un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (PE) (Southern-Biotechnologies Inc.) para determinar la fluorescencia dos; y yoduro de propidio para discriminar células muertas en fluorescencia tres (Sasaki *et al*, 1987).

Todas las incubaciones se realizaron a 4°C y en oscuridad.

Las células se llevaron finalmente a tubos de citometría (Falcon 2025) para su posterior análisis.

9.C.- Anticuerpos como reactivos de citometría. Purificación de ascitis.-

Ascitis purificadas o sobrenadantes de los siguientes anticuerpos fueron utilizadas para los diferentes marcajes fluorescentes:

ANTICUERPOS (Dilución)	ESPECIFICIDAD	CÉLULAS	REFERENCIAS
74-12-4 (IgG2b,k) (1/20)	anti-CD4	Linfocitos Th	Pescovitz <i>et al.</i> , 1984
76-2-11 (IgG2a,k) (1/50) PT81B (IgG2b) (1/100)	anti-CD8 anti-CD8	Linfocitos Tc Linfocitos Tc	Pescovitz <i>et al.</i> , 1984 Pullman, WA
MSA₄ (IgG2a) (1/100)	anti-CD2	Linfocitos T	Hammerberg y Schurig, 1986
5C9 (IgG1,k) (Sobrenadante puro)	anti-IgM	Linfocitos B	Paul <i>et al.</i> , 1985
74-11-10 (IgG2b,k)(1/50)	anti-SLA I polimórfico	Panleucocitario	Pescovitz <i>et al.</i> , 1984
MSA₃ (IgG2b,k) (1/50)	anti-SLA II-DRw	Linfocitos T, B y macrófagos	Hammerberg y Schurig, 1986
74-22-15 (IgG1,k) (1/75)	SWC ₃	Macrófagos, granulocitos	Pescovitz <i>et al.</i> , 1984
1C5 (IgG2a, k) (1/50)		Panleucocitario	CISA-INIA
MUT76A (1/100)	anti-CD11a(CD18 like)	Panleucocitario	Pullman, WA
BAT81A (1/100)	anti-CD44	Panleucocitario	Pullman, WA
K231-3B2 (IgG1) (1/20)	anti-rIL2	Linfocitos T, 70% blastos ⁺	Bailey <i>et al.</i> , 1992
174-F11.8 (Sobrenadante puro)	anti-P30	Células infectadas	Afonso <i>et al.</i> , 1992

Todos los anticuerpos utilizados han sido descritos y caracterizados en el "First International Swine CD Workshop" publicado en la revista *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 43, 1-3, 1994.

Los anticuerpos del líquido ascítico, obtenidos tras la inoculación de los hibridomas en la cavidad peritoneal de ratones, fueron purificados en columna de proteína A sefarosa (Pharmacia) para la obtención de isotipos únicos.

La concentración final de los mismos se valoró en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-120-02) a una longitud de onda de 280 nm.

9.D.-Marcaje de anticuerpos con biotina.-

Se preparó una solución stock de biotina (Calbiochem®) en Dimetil sulfóxido (DMSO) (Merck) a una concentración de 1 mg/ml.

Un mililitro de la suspensión del anticuerpo se incubó durante cuatro horas a 37°C con 125 µl de la solución de biotina. Posteriormente, el anticuerpo marcado fue dializado en tampón fosfato durante 24 horas a 4°C.

9.E.-Adquisición de células y análisis de resultados.-

Las suspensiones celulares, marcadas con diferentes anticuerpos fueron adquiridas y definidas mediante un citómetro de flujo FACscan (Becton-Dickinson) (Canals *et al*, 1992).

En el citómetro de flujo una suspensión de células es bombeada a través de un tubo muy fino de forma que las células pasan en línea por el circuito. Un detector laser se dirige a través del flujo de células y se miden los efectos de la radiación laser sobre las células, mediante la captación de la radiación con diferentes fotomultiplicadores de forma que se pueden valorar características como

el tamaño celular (Forward light scatter o FSC), rugosidad de la superficie celular y complejidad del citoplasma (Side light scatter o SSC); o si se utilizan anticuerpos fluorescentes para marcar las células, pueden caracterizarse diversas poblaciones de células (Fluorescencia 1, Fluorescencia 2, Fluorescencia 3) (Coligan *et al*, 1992).

En nuestras pruebas experimentales las fluorescencias se evaluaron según un control de calibración del citómetro y tras un ajuste mediante la utilización de controles positivos, dobles positivos y negativos para cada proceso de adquisición.

El análisis de los datos se llevó a cabo sobre un promedio de 10.000 células en el programa Lysis II. Los anticuerpos linfocitarios fueron analizados en la población linfocitos y los anticuerpos leucocitarios en la población de mononucleares.

Las subpoblaciones de células mononucleares porcinas no presentan una diferenciación tan evidente en el diagrama de dos dimensiones FSC-SSC, a diferencia de otras especies, aunque normalmente los monocitos aparecen de mayor tamaño y complejidad que los linfocitos.

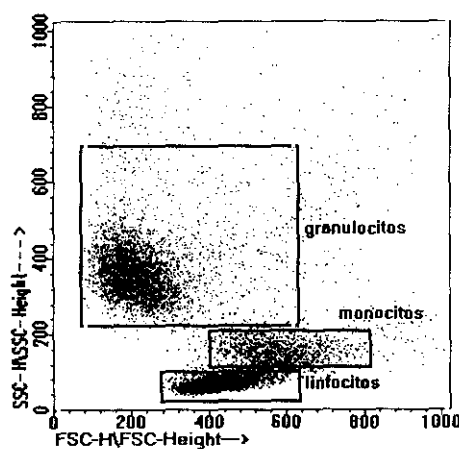


Fig.1.-Diagrama habitual de dos dimensiones de leucocitos de sangre porcina. En el eje de las X se representa el tamaño celular relativo y en el eje de las Y su complejidad relativa.

Los porcentajes de células positivas se obtuvieron mediante el análisis de los histogramas en los cuales se representó la intensidad de fluorescencia de las células marcadas frente al número de células. Los dobles marcajes se analizaron en representaciones gráficas de dos dimensiones, enfrentando la fluorescencia uno (verde-eje de las X) con la fluorescencia dos (rojo-eje de las Y). El porcentaje de células dobles positivas era el obtenido en el cuadrante superior derecho.

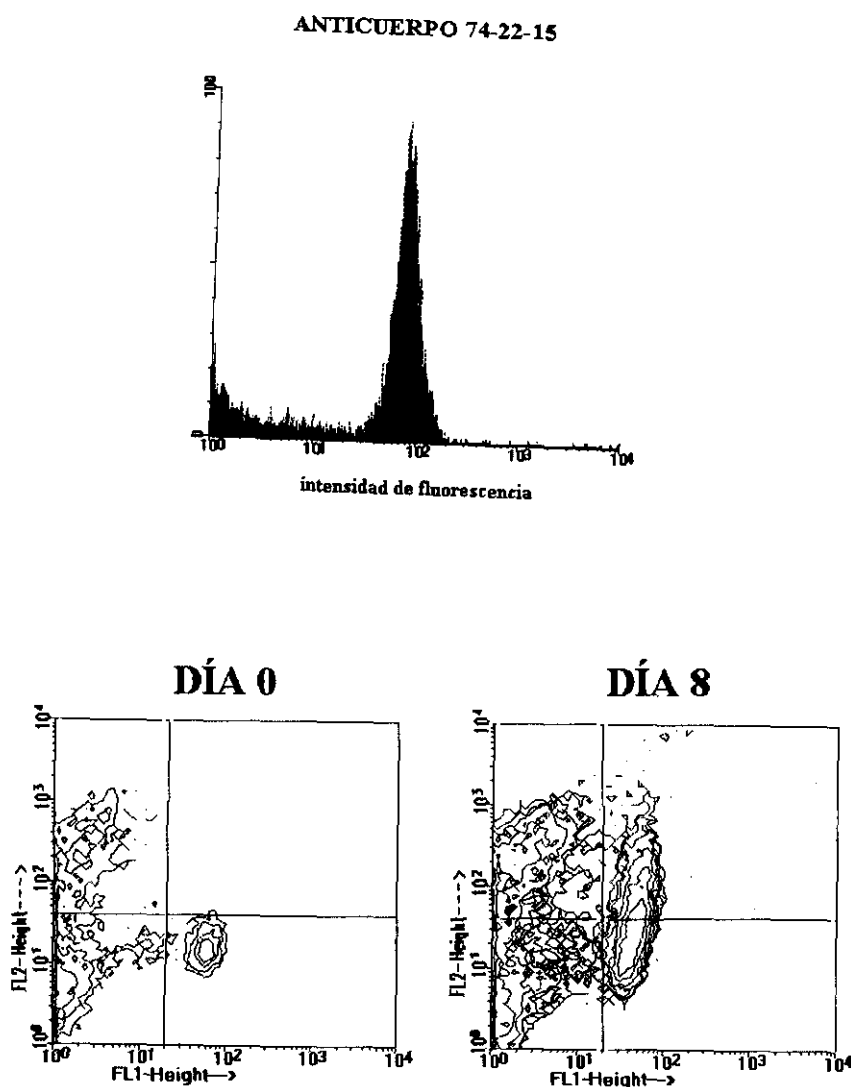


Fig. 2.- Histograma de fluorescencia y representación de fluorecencias en dos dimensiones.

10.- TÉCNICAS DE INMUNOCITOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA. HISTOPATOLOGÍA.

10.A.- Técnica de inmunocitoquímica en preparaciones de citocentrífuga.-

Se realizaron citoextensiones de células Vero infectadas con el aislado E75CV₁-4 en una citocentrífuga (Shandon). Las extensiones se fijaron en metanol durante 3 minutos.

Para realizar las técnicas de inmunocitoquímica se procedió en primer lugar a la inactivación de la peroxidasa endógena de las células con ácido peryódico al 0.15% (Merck) durante 15 minutos. Posteriormente se realizaron varios lavados con TBS (Tris Buffer Phosphate)(Tris 0,05M; ClNa 0,145M; pH 7,4). Sin dejar secar las células procedimos a incubar con los diferentes anticuerpos frente al virus de la PPA (Whyard, 1985), que fueron anti-P30, sobrenadante puro de hibridomas de ratón (proteína temprana del virus, Afonso *et al*, 1992); anti-p54, antisuero porcino purificado dilución 1/50 marcado con biotina (proteína estructural del virus, Rodríguez, F *et al*, 1994) y un policlonal anti-VPPA, antisuero porcino purificado dilución 1/50 marcado con biotina. La incubación con estos anticuerpos diluidos en TBS se llevó a cabo en cámara húmeda durante 1 hora a 37°C.

En el siguiente se procedió a incubar con el conjugado extravidina-peroxidasa dilución 1/200 (Sigma) durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente, para los anticuerpos marcados con biotina. En el caso del anticuerpo anti-P30 se realizó un paso previo incubando con conjugados anti-ratón-biotina dilución 1/100 (Sigma) incubando en cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente.

Tras la incubación con cada anticuerpo se realizaron lavados con TBS.

El sustrato utilizado para la reacción colorimétrica fueron 6 mg de diaminobenzidina (Sigma) diluidos en 10 ml de TBS con 3 μ l de H₂O₂ al 33%. Las preparaciones se incubaron con el sustrato durante 8 minutos y se frenó la reacción mediante lavados en agua destilada.

Las preparaciones se contrastaron con Hematoxilina.

La muestra negativa consistió en células Vero sin infectar tratadas de igual forma.

10.B.- Preparación de tejidos e histopatología.-

Los tejidos de los cerdos, obtenidos tras el sacrificio y realización de la necropsia, fueron fijados en formol tamponado al 10%. Tras su fijación realizamos la toma de muestras y la inclusión de las mismas en un preparado plástico (Panreac) mediante un aparato de inclusión Leica (Jung, Histokinette 2000).

Se realizaron cortes de 3-4 μm de los diferentes bloques en un microtomo transistorizado Leica (Jung, RM 2055), en portas tratados con poli-L-lisina diluida al 1/10 en agua destilada (Sigma).

Las técnicas de tinción realizadas para llevar a cabo los estudios histopatológicos fueron Hematoxilina-eosina, ácido peryódico de Schiff (PAS), tricrómico de Masson y la técnica de plata de Weigert para fibras reticulares, según la metodología habitual.

10.C.- Técnica de inmunohistoquímica.-

Los cortes de tejido, preparados según hemos descrito, fueron desparafinados según la técnica habitual e hidratados durante 15 minutos. Después recibieron un tratamiento de microondas en baño de tampón citrato 10mM (ácido cítrico 0,1M, 9 ml + citrato sódico 0,1M, 41 ml; diluido en 500 ml de agua destilada) durante 15 minutos. Posteriormente se dejaron enfriar durante 20 minutos en ese mismo tampón.

Tras ello realizamos la inhibición de la peroxidasa endógena mediante

tratamiento con H_2O_2 al 3% en metanol durante 30 minutos. Las muestras se lavaron posteriormente en TBS-Tween 20 (0,01%) durante 15 minutos, y en TBS durante 10 minutos. Realizamos un bloqueo de uniones inespecíficas tratando con suero normal de cabra 1/100 durante una hora. A continuación se retiró el suero sin lavar la preparación y se depositó el anticuerpo policlonal frente al virus de la PPA marcado con biotina a una dilución 1/10. Los tejidos se incubaron con este anticuerpo durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Tras lavar en TBS se incubaron las muestras con conjugado extravidina-peroxidasa (Sigma) dilución 1/200 durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.

El sustrato de la reacción utilizado fue diaminobenzidina (Sigma) diluida en TBS (20 mg en 50 ml) añadiendo 40 μ l de H_2O_2 al 33% con posterior filtrado previamente a su uso. Las preparaciones se incubaron durante 5 minutos con el sustrato, tras lo cual se lavaron en agua destilada.

Las preparaciones se contrastaron con Hematoxilina.

Las muestras negativas consistieron en tejidos de animales no infectados y en tejidos de los cerdos infectados no incubados con el anticuerpo primario anti-VPPA.

Las células positivas de los diferentes órganos se evaluaron sobre un total de 10 campos de 400 aumentos seleccionados al azar.

B.- EXPERIMENTOS *IN VITRO*

1.- VIRUS

Para los ensayos de infecciones *in vitro* de células mononucleares utilizamos la cepa atenuada E75 CV₁-4 y la cepa virulenta E70L7, a una dosis de 10⁴ DI₅₀ por pocillo.

En los ensayos de formación de placas para neutralización se utilizaron las cepas 608VR13, 608VR79 y 1207VR15 a una dosis de 100 UFP por pocillo de células Vero.

En las infecciones de leucocitos mononucleares para valoración del efecto del virus sobre las células utilizamos las cepas virulentas E75L7, E70L7, 608L10, 646L7 y las atenuadas E75CV₁-4, Ba71VR2, 608VR14, E70MS47 y E70MS84 dos multiplicidades de infección (MI) de 1. En cultivos de macrófagos se utilizó una MI de 0,5 para el estudio de antígenos superficiales.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado.

2.- EFECTO BLASTOGÉNICO EN CÉLULAS MONONUCLEARES EXTRAÍDAS DE SANGRE PROCEDENTE DE CERDOS INFECTADOS

La concanavalina A (ConA) es una proteína tetramérica polivalente obtenida de la planta *Canavalia ensiformis* que se une específicamente a azúcares α -D-manosa y α -D-glucosa de la membrana de los linfocitos. Es un mitógeno de linfocitos T y aunque es capaz de unirse a azúcares de la membrana de linfocitos B en éstas no estimula la división (Berger, 1979; Tizard, 1992).

Una vez en cultivo con el mitógeno, los linfocitos empiezan a dividirse, sintetizan ADN, y toman nucleótidos del medio. De esta forma al suministrar en el medio una pequeña cantidad de timidina marcada con el isótopo radioactivo del

hidrógeno (^3H) ($0.5 \mu\text{Ci/pocillo}$), ésta se incorpora en el ADN de las células en división, pudiendo ser detectada la radioactividad emitida por las células.

Tras el aislamiento de las células en sedimentación con dextrano y en gradiente de Percoll, 4×10^5 células fueron depositadas en cada pocillo de una placa 96 pocillo de fondo plano en medio RPMI completo (Canals *et al*, 1992). En el medio se incorporaron cantidades crecientes del mitógeno concanavalina A (ConA) así como controles sólo con medio. Cada una de las concentraciones se realizó por triplicado. Las concentraciones utilizadas variaron entre 2 y $10 \mu\text{g/ml}$, según el tipo de experimento realizado.

Tras tres días de incubación a 37°C , se realizó un pulso de timidina durante 6 horas ($0,5 \mu\text{Ci/pocillo}$). La radioactividad incorporada en los filtros mediante un Skatron Cell Harvester, fue valorada en un contador de centelleo (Beckman Scintillation Counter).

La cantidad de radioactividad incorporada en las células tratadas con la lectina se comparó con la incorporada en células no tratadas. Esta relación se conoce como índice de estimulación.

3.-INFECCIÓN *in vitro* DE CÉLULAS MONONUCLEARES PARA EL ESTUDIO DE ANTÍGENOS SUPERFICIALES

Las células mononucleares, extraídas según el método mencionado arriba, fueron depositados en placas de 24 pocillos de fondo plano a una concentración de unos 4×10^6 células/pocillo en 2 ml de medio RPMI completo. Las células fueron infectadas con las cepas atenuada E75 CV₁-4 y virulenta E70 L7 a una MI de 1, y mantenidas con el virus durante intervalos de tiempo de 4, 14 y 24 horas, tras lo cual las células fueron recogidas en tubos de citometría y sus antígenos superficiales valorados mediante diferentes marcadores. Se utilizó un control de

células al tiempo cero de cultivo y sin infectar, y otros controles de células sin infectar a los diferentes tiempos de cultivo.

Cinco mil células positivas al marcador 74-22-14 fueron adquiridas por el citómetro FACscan (Becton Dickinson) y sus antígenos analizados mediante el programa Lysis II (Hewlett-Packard).

Los cultivos de macrófagos se obtuvieron tras mantener durante cuatro días un cultivo de leucocitos en suero autólogo. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se mantuvieron en medio RPMI con 30% de suero porcino inactivado. Estos cultivos se infectaron con los diferentes virus a una MI de 0,5 durante 14 y 24 horas.

4.- VALORACIÓN DEL EFECTO BLASTOGÉNICO EN CULTIVOS INFECTADOS.-

Se prepararon cultivos de células mononucleares en placas de 96 pocillos de fondo plano, depositando en cada pocillo unas 4×10^5 células.

Estas células fueron infectadas con diferentes aislados a multiplicidad de infección aproximadamente igual a uno (una partícula vírica por célula susceptible, considerando como tal a los monocitos), añadiendo diversas sustancias inhibidoras o promotoras de la blastogénesis y mantenidas a diferentes tiempos en cultivo. Así utilizamos ConA (Sigma) a una concentración de $2 \mu\text{g/ml}$ e interlequina-2 recombinante humana (Genzyme) a concentración final de 60 unidades/pocillo. Se utilizó CsA (Sandimum®, Sandoz) a una concentración de 400 ng/ml, como inhibidor de la blastogénesis.

4.A.- Estudio del ciclo de ADN en células infectadas.-

Para el estudio del ciclo de ADN seguimos la metodología de Krishan (1975). Las células extraídas de las placas de cultivo, mantenidas en atmósfera de CO_2

(5%) a 37°C durante tres días con los diferentes aislados víricos, se lavaron con PBS-glucosa (PBS + 1g/l glucosa y filtrado) y el sedimento de células se fijó con alcohol frío al 70% por perfusión lenta de las células.

Posteriormente el sedimento de células se resuspendió en PBS-glucosa con RNAsa (100 KUnitz/ml) y yoduro de propidio (50 mg/ml), mantenidas al menos durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegidas de exposición directa a la luz. Diez mil células fueron adquiridas mediante el citómetro de flujo FACscan a velocidad lenta, y el ciclo de ADN se analizó utilizando el programa Lysis II.

4.B- Incorporación de timidina tritiada en células en proliferación.-

Tras mantener los cultivos durante 3 días a 37°C en atmósfera húmeda de 5% de CO₂, se realizó un pulso con timidina tritiada 0.5 μ Ci/pocillo, que se mantuvo durante 6 horas. La lectura de placas se realizó como ya hemos descrito anteriormente (apartado 2).

5.- DETECCIÓN DE APOPTOSIS Y MUERTE CELULAR EN CULTIVOS DE CÉLULAS MONONUCLEARES INFECTADAS

5.A.- Valoración de apoptosis por morfología celular.-

Sobre extensiones preparadas por citocentrifugación se realizaron las técnicas de coloración citológica Giemsa lento y Hematoxilina de Harris, valorando la morfología del núcleo y el citoplasma.

5.B.- Valoración de muerte celular por citometría de flujo.-

Las células mantenidas en cultivo con los diferentes estímulos fueron recogidas y lavadas con tampón de citometría. Estas células se tiñeron con yoduro de propidio, previo a la adquisición en el citómetro FACscan (Becton-Dickinson).

La lectura se realizó en fluorescencia tres, y con los parámetros tamaño (FSC) y complejidad celular (SSC). El análisis de los resultados se realizó mediante el programa Lysis II (Hewlett-Packard).

5.C.- Valoración de apoptosis en geles de agarosa.-

Para la valoración de la fragmentación del ADN utilizamos el método de electroforesis en geles de agarosa del ácido nucleico extraído de las células (Coligan *et al*, 1992; Punt *et al*, 1994; Sun *et al*, 1994).

Se extrajo el ácido nucleico tras la fragmentación de las células en tampón de lisis (Tris 10 mM pH 7,8; EDTA 5mM; SDS 0,5%; proteinasa K 0,6 mg/ml) durante 1 hora a 50°C. El ADN de alto peso molecular se precipitó con C1Na 1 M durante toda la noche a 4°C. Se centrifugaron a 4°C (12000 rpm durante 20 minutos) y se recuperó el sobrenadante, en donde se obtiene el ADN de bajo peso molecular. Este ADN se extrajo finalmente con fenol/cloroformo (Appligene). Esta fracción se conservó a -20°C con 2-2.5 volúmenes de etanol al 70%.

Las muestras así mantenidas se centrifugaron durante 20 minutos a 12000 rpm a 4°C y se retiró el sobrenadante. Se dejaron secar los pellet a temperatura ambiente y luego se resuspendieron en 13 µl de TE (Tris 10 mM, pH7,5; EDTA 1 mM) . A esta suspensión se añadieron 2 µl de ARNasa (Sigma) de una solución de 10 mg/ml y se incubaron a 37°C durante una hora.

Finalmente se mezclaron con 3 µl de colorante 6x para electroforesis y se llevaron a los diferentes pocillos del minigel de agarosa.

El gel de agarosa al 2% se preparó diluyendo 1,2g con 60 ml de TAE 1x (Tris acetato 0,04 M; EDTA 0,001 M) con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. El gel

polimerizado se sumergió en la cámara de electroforesis con TAE 1x.

La electroforesis se realizó durante 2 horas a 88 voltios y el gel se observó en un transiluminador de ultravioleta.

5.D.- Valoración de apoptosis por ELISA.-

El fundamento de esta técnica lo encontramos en la detección de fragmentos oligonucleosomales del ADN celular que se producen en el núcleo tras la activación de ADNasas. Estas enzimas actúan sobre los puntos sensibles de unión internucleosomal en donde no existe la protección de las histonas. Los fragmentos oligonucleosomales están formados por fracciones de unos 200 pares de bases de ADN asociado a varias subunidades de proteínas histonas, y se producen durante el proceso de apoptosis celular. Pueden ser detectados mediante la utilización de anticuerpos frente a proteínas histonas en una reacción de enzimoimmunoensayo tipo "sandwich".

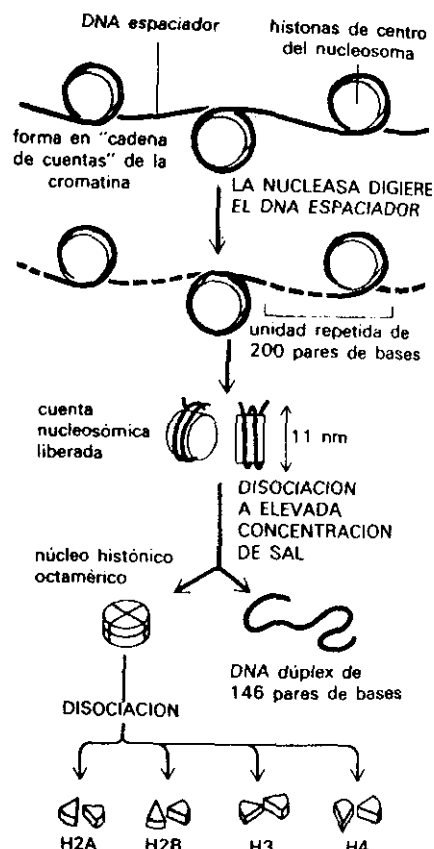


Fig.3.- Estructura de los nucleosomas (*Biología molecular de la célula, Alberts et al,Eds., 1992*)

Las células extraídas de las placas de cultivo de lavaron con medio RPMI completo y el sedimento de células se diluyó en 500 μ l del tampón de lisis (Boehringer-Manheim) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugaron las células a 12000 rpm durante 12 minutos. En el sedimento quedan los restos del citoplasma y el ADN de alto peso molecular. Se recogieron 400 μ l del sobrenadante. Una parte de la muestra así obtenida se diluyó al 1/10 para la valoración por ELISA.

Previamente se preparó la placa de ELISA incubando 100 μ l del anticuerpo anti-histona (Boehringer-Manheim) durante una hora a temperatura ambiente. Tras retirar el anticuerpo se incubó la placa con tampón bloqueante (Boehringer-Manheim) durante una hora a temperatura ambiente. Después se procedió a lavar la placa varias veces con tampón de lavado (Boehringer-Manheim).

Cien μ l de la muestra se llevaron a los pocillos de la placa de ELISA, analizando cada muestra por duplicado. El control de fondo fueron dos pocillos sin muestra; hubo también un control de células viables (extraídas en el mismo día y sin cultivar) y un control de células sin infectar mantenidas en cultivo el mismo tiempo. Las muestras se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados con el tampón, se incubaron los pocillos con el anticuerpo conjugado preparado comercialmente anti-ADN-POD (Boehringer-Manheim), durante 90 minutos a temperatura ambiente. Nuevos lavados precedieron a la incubación con el sustrato ABTS (Boehringer-Manheim), incubándose con éste durante unos 20 minutos en agitación. La valoración de la densidad óptica se realizó a 405 y 620 nm en un espectrofotómetro Cultek asistido por ordenador.

6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIONES GRÁFICAS.-

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático FigP 6.0, comparando medias mediante el análisis *t*-Student para varianzas diferentes, y considerando una diferencia significativa para $p < 0,05$.

Los valores de diferencias porcentuales se calcularon respecto a los valores iniciales de cada parámetro en días preinoculación.

Las representaciones gráficas se realizaron utilizando los programas de Software FigP 6.0 y Excel 4.0.

RESULTADOS

RESULTADOS

A.- ESTUDIOS *in vivo* SOBRE PATOGENIA DE LA PPA

1.- MODELO EXPERIMENTAL DEL VPPA ATENUADO E75CV₁-4

Este modelo experimental es un buen ejemplo de lo que sucede en la enfermedad de campo, observándose diversos cursos clínicos durante la infección (ver materiales y métodos). Algunos cerdos sufren la enfermedad de forma aguda, otros de forma subaguda e incluso otros cursan como animales asintomáticos y permanecen como portadores crónicos del virus. Además la importancia de este estudio concreto de la infección radica en que con este aislado se ha conseguido inducir protección frente a la infección con el virus homólogo virulento en los animales supervivientes.

Elegimos la vía de infección oronasal por ser la ruta de infección natural más frecuente (Sánchez-Botija, 1982). Esta vía de infección ha sido utilizada previamente y proporciona mayor diversidad de desarrollos clínicos (Genovesi *et al*, 1988; Alcaraz *et al*, 1992). En nuestro desarrollo experimental fue amplio el rango de viremias que presentaron los animales y también obtuvimos ejemplos de los diversos cursos clínicos.

1.A.- Curso de la infección. Formas clínicas. Temperatura.-

Veinte animales fueron infectados con este modelo experimental, nueve de ellos con integridad de su sistema inmune. Los nueve cerdos pertenecientes a este grupo presentaron diferentes manifestaciones clínicas pudiendo clasificarse en

formas agudas, subagudas o crónicas según su evolución; desde la ausencia de síntomas evidentes hasta la muerte en fase aguda o en fase subaguda.

La fase aguda cursó con alteraciones graves de la coagulación, caracterizadas fundamentalmente por la formación de grandes hematomas en la zona de sangría, la ausencia de coágulo visible en el tubo de extracción y hemorragias postextracción incoercibles que terminaron con la muerte del animal (tabla 1).

Los cerdos con formas subagudas presentaron síntomas generales de pérdida de apetito, adelgazamiento, debilidad, postración, y alteraciones respiratorias. A lo largo de su evolución algunos fallecieron tras un período de reactivación sintomatológica; dos cerdos murieron durante el primer mes tras la infección.

Otros seis animales supervivientes presentaron escasa sintomatología o evolucionaron de forma inaparente. Cuatro cerdos se sacrificaron en la tercera semana postinfección y dos se dejaron a su evolución, permaneciendo como enfermos crónicos, con algunas fases de recaída en las cuales pudimos observar una hipertermia transitoria, pérdida de apetito, debilidad y emaciación crónica. Éstos fueron sacrificados durante el cuarto y quinto mes postinfección respectivamente.

Los síntomas más característicos observados para este tipo de proceso crónico fueron principalmente inapetencia, emaciación crónica y síntomas pulmonares como ha sido descrito previamente (Moulton y Coggins, 1968; Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1983). Las principales causas de la mortalidad desarrollada (3/9, 33%) fueron las alteraciones de la coagulación y la enfermedad crónica broncopulmonar.

Algunos cerdos no desarrollaron viremia (cerdos 6 y 8), otros no desarrollaron ninguna sintomatología aparente o tan sólo un ligera hipertermia (tabla 1), pero todos produjeron anticuerpos frente al virus (ver apartado 1.C). El curso asintomático o con escasa sintomatología de esta infección, sin apenas viremia y con producción de anticuerpos frente al virus, hace de éste un modelo bastante idóneo para los experimentos de protección.

Tabla 1. Cuadro sintomático y curso de la enfermedad.

Animal/Inóculo	Sintomatología	Desarrollo
Cerdo 1/ 10^{5.6} DI₅₀	Debilidad, apatía, pérdida de apetito, eritema cutáneo (días 7-9). Hipertermia (días 7-8).	PPA aguda. Muerto día 9pi.
Cerdo 2/ 10^{5.6} DI₅₀	Debilidad, apatía, pérdida de apetito (días 7-11). Hipertermia (días 7-10).	PPA subaguda.
Cerdo 3/ 10^{5.6} DI₅₀	Debilidad, adelgazamiento (días 7-9) disnea, tos, respiración abdominal (días 23-36). Hipertermia (días 7-8, 18-21, 30-31).	PPA subaguda.
Cerdo 4/ 10^{5.6} DI₅₀	Debilidad, pérdida de apetito (días 7-11), repetición de síntomas (días 25-26). Hipertermia (días 7-10)	PPA crónica.
Cerdo 5/ 10^{5.6} DI₅₀	Debilidad, pérdida de apetito (días 7-14). Adelgazamiento progresivo (días 36-40), síntomas nerviosos (días 150-158).Hipertermia (días 7-10, 36)	PPA crónica.
Cerdo 6/ 10^{5.6} DI₅₀	Asintomático.	PPA inaparente.
Cerdo 7/ 10^{5.6} DI₅₀	Hipertermia (días 6-11, y día 18).	PPA inaparente.
Cerdo 8/ 10^{5.6} DI₅₀	Hipertermia (días 7-9)	PPA inaparente.
Cerdo 9/ 10^{5.6} DI₅₀	Ligera hipertermia (día 6)	PPA inaparente.

La hipertermia inicial desarrollada durante algunas fases de la infección (días 6-9 postinfección) es una de las principales manifestaciones de esta enfermedad y coincidió con la presencia detectable de virus en sangre periférica (Montgomery, 1921; Moulton y Coggins, 1968; Coggins *et al*, 1968).

Durante nuestro desarrollo experimental hemos observado un aumento significativo ($p < 0.02$) de la temperatura media normal entre los 7 y 9 días postinfección, que de forma progresiva retornó a la normalidad. Algunos cerdos presentaron después fases febriles que coincidieron con una acentuación de la sintomatología (fig. 1).

Los cerdos que no desarrollaron viremia durante el período experimental tampoco presentaron hipertermia detectable o bien fue ligera (tabla 1).

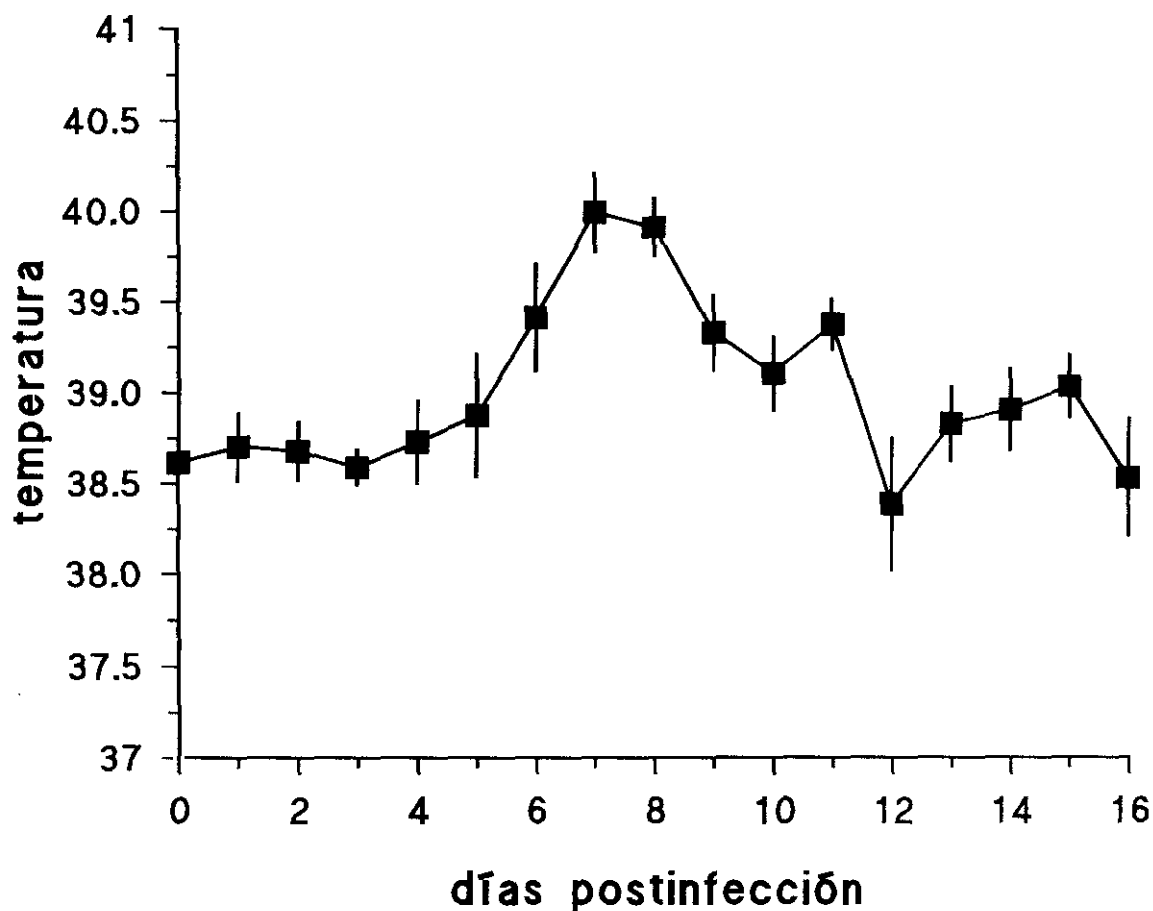


Fig. 1.- Evolución de la temperatura media en cerdos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4.

1.B.- Anatomía patológica.-

Agrupamos las lesiones según las formas clínicas, y pudimos comprobar que cada grupo constituye una entidad clínicopatológica bien determinada: forma aguda, forma subaguda y forma crónica.

a.- Peste porcina africana aguda:

Se caracterizó por la existencia de linfadenopatía hemorrágica o necrótico-hemorrágica generalizada, sobre todo en ganglios hepatogástricos, mesentéricos y renales. Hepatoesplenomegalia congestiva, con cianosis esplénica y hemorragias en diversos órganos: vesícula biliar, neumonía intersticial en lóbulos apical y medio de ambos pulmones e hidropericardias.

Las lesiones microscópicas de la PPA aguda son más características del aislado virulento E70, aunque pueden aparecer con el aislado atenuado en pequeña proporción por lo que las describiremos en este capítulo.

b.- Peste porcina africana subaguda:

En este grupo las lesiones macroscópicas más frecuentes fueron linfadenopatía hipertrófica localizada preferentemente en las regiones de cabeza, cuello y tórax, con hemorragias sobre todo en los ganglios linfáticos del territorio abdominal. Era característica la esplenomegalia congestiva, aunque de menor intensidad que en el primer grupo. Los pulmones presentaron neumonía intersticial lobar, afectando a lóbulos apicales y medios, con edema traqueobronquial e hidrotórax. En algún caso se complicó con abscesos o secuestros en el parénquima acompañados de pleuritis fibrinosa focal. Además existía una hepatomegalia congestiva y congestión de la medular renal.

Microscópicamente las lesiones correspondieron a una linfadenitis vírica de patrón mixto folicular y difuso, con algunas imágenes de mitosis en centros foliculares. En manto y zona paracortical las células más frecuentes fueron linfocitos inmaduros y maduros, y abundantes blastos en las zonas de hiperplasia, mientras que en el interior de senos apreciamos abundantes histiocitos y abundantes eosinófilos (foto 1).

En el bazo se desarrolló esplenitis vírica, observándose acúmulos de células epitelioides en la pulpa roja y pulpa blanca. Además se encontraron lesiones de arteritis necrotizantes en arteriolas (foto 2). Las arteriolas afectadas presentaban en su pared necrosis fibrinoide con pérdida de estructura de sus capas, depósito de material hialino e infiltrado inflamatorio polimorfonuclear que se extendía hacia el manguito linfoide adyacente.

Los pulmones presentaban neumonía intersticial proliferativa, con zonas de fibrosis y angiogénesis y descamación de macrófagos, y presencia de algunas células gigantes. El tejido linfoide asociado a bronquiolos presentaba hipertrofia e hiperplasia y las células mostraban tendencia al epiteliotropismo. En los vasos de pequeño y mediano calibre era frecuente la presencia de trombos hialinos (foto 3). Frecuentemente aparecía complicada con una neumonía purulenta.

En riñones existía glomerulonefritis mesangioproliferativa multifocal, con engrosamiento de las asas capilares glomerulares, y presencia de microtrombos en vasos y cilindros hialinos en túbulos (foto 4).

Otras lesiones fueron hepatitis crónica vírica con moderados infiltrados periportales y sinusoidales, y focos de necrosis hepatocelulares intralobulillares y periportales. También se observó edema con dilatación de los espacios de Disse.

c.- Peste porcina africana crónica:

Al igual que en la PPA subaguda era característica una linfadenopatía hipertrófica generalizada. También existía marcada hipertrofia de placas de Peyer. Se observó esplenomegalia con hipertrofia de la pulpa blanca y fibrosis con aumento de la consistencia.

Microscópicamente la característica más llamativa fue la hipertrofia-hiperplasia de órganos y estructuras linfoides, tanto ganglios linfáticos como tonsilas, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas (bronquiolos e intestino), con frecuentes figuras de mitosis (más de 4 por campo de 400x). En ganglios y bazo también apreciamos hiperplasia de histiocitos (foto 5).

Los pulmones presentaban neumonía intersticial linfocitaria difusa, localizada en lóbulos apicales, medios y accesorio, y complicada en ocasiones con una

bronconeumonía purulenta e hidrotórax. Existía abundante infiltrado inflamatorio mononuclear con histiocitos ocupando los tabiques alveolares, produciendo consolidación. Se observaban frecuentes imágenes de angiogénesis y fibrosis. Aparecieron células gigantes en algunos tabiques interalveolares. También se observaron frecuentes acúmulos linfoides peribronquiolares que penetraban hacia el epitelio con destrucción del músculo liso subyacente bronquiolar subyacente y periarteriolitis (foto 6). El corazón presentaba pericarditis fibrinosa con derrame seroso.

En los riñones se observaba estriación blanquecina en el límite corticomedular y congestión medular. Microscópicamente correspondía con una glomerulonefritis crónica mesangioproliferativa, con depósito mesangial eosinófilo. Además presentaron hipertrofia e hiperplasia de podocitos y desdoblamiento de asas capilares glomerulares. En espacio urinario y luces tubulares existía acúmulo de material proteináceo. En la zona medular se desarrolló una nefritis intersticial focal con tubulonefrosis y cilindros granulosos.

En el hígado se observaba una hepatopatía crónica con formación de puentes fibrosos y tendencia a la cirrosis (foto 7). En la microcirculación se observaron frecuentes trombosis. Además existía congestión centrolobulillar crónica.

Otras lesiones de gran interés fueron la existencia de artritis crónica, sobre todo en articulación carpo-metacarpiana, así como alteraciones cutáneas con necrosis de todas las capas de la piel, que afectaba a grasa subcutánea y músculo subyacente.

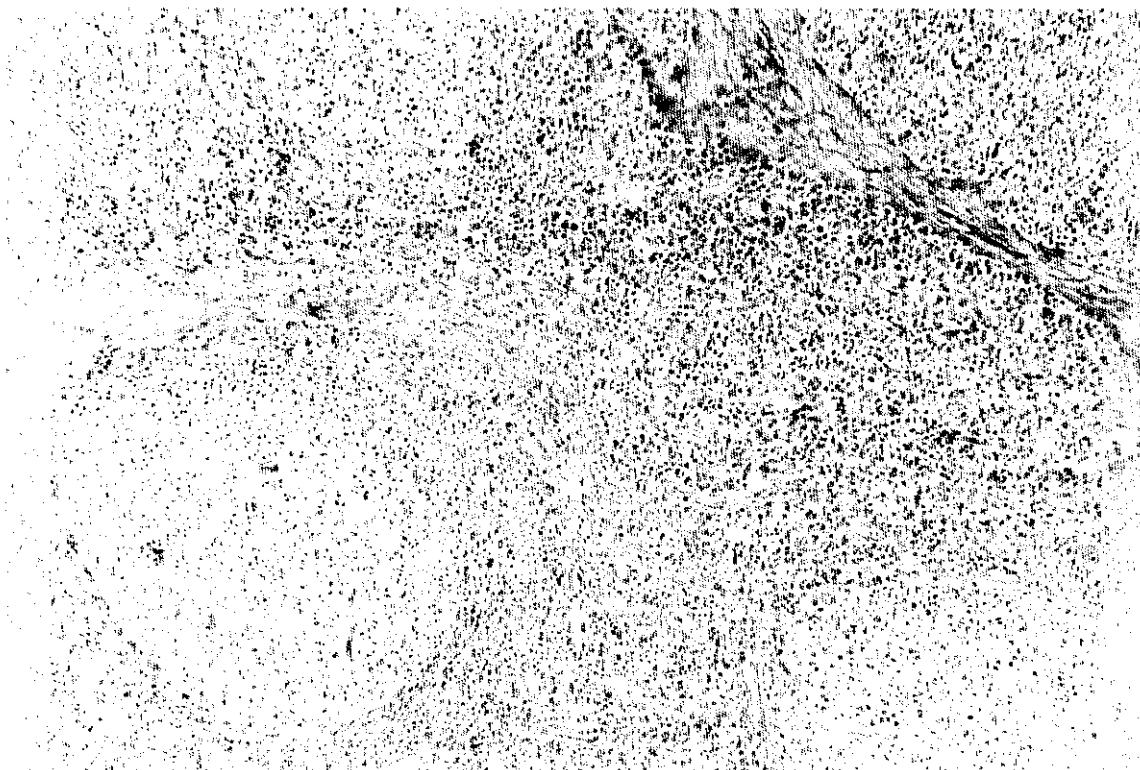


Foto 1.- Linfadenitis vírica en fase subaguda de PPA. Marcada hiperplasia de folículos linfoides e hipercelularidad en zonas interfolliculares. H-E. 100x

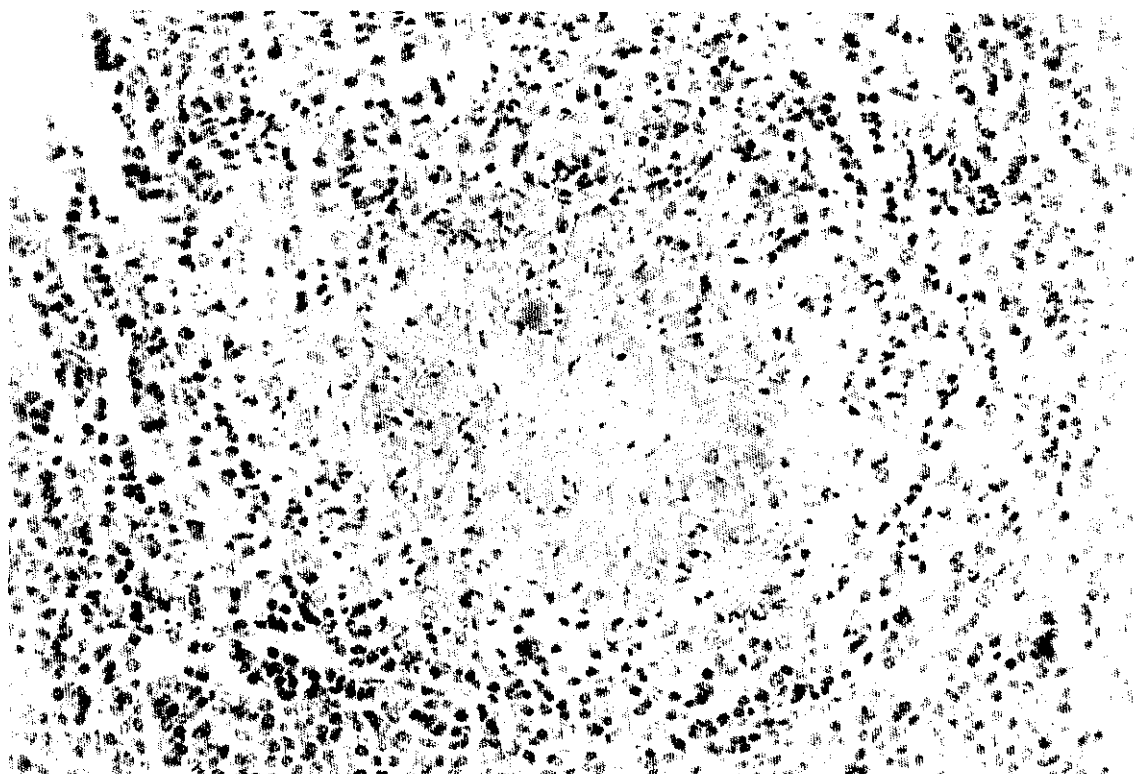


Foto 2.- Arteritis necrotizante. Bazo en fase subaguda de PPA. H-E. 100x

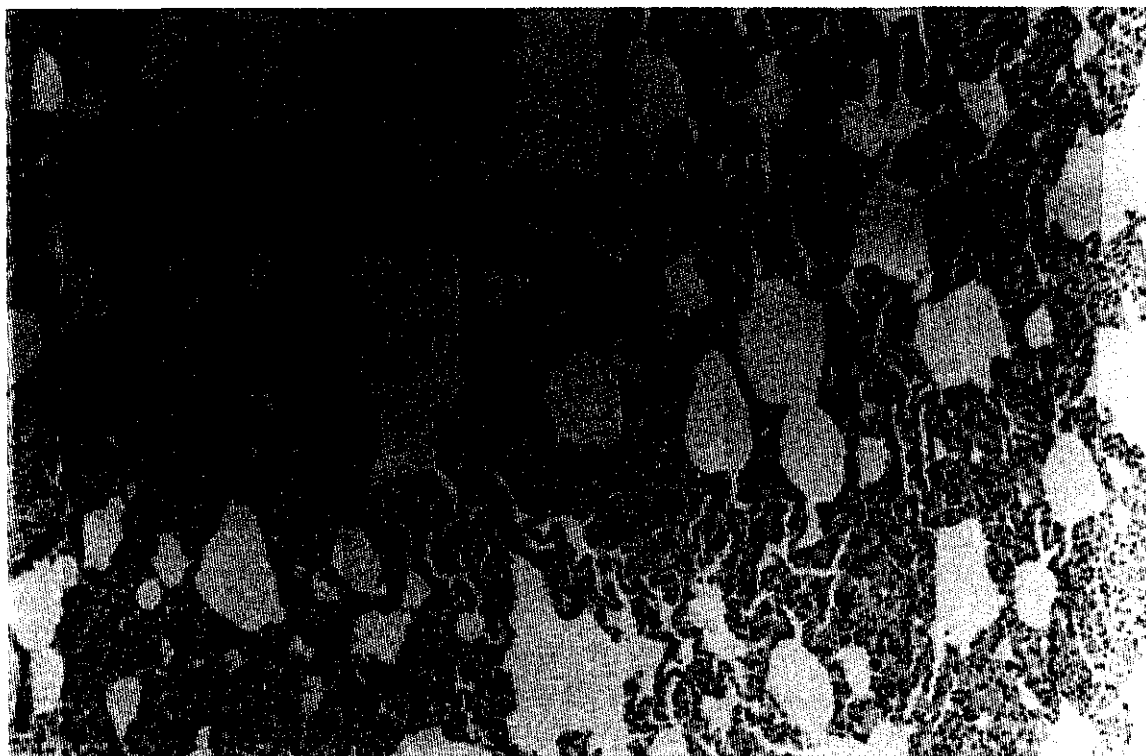


Foto 3.- Neumonía bronquiolo-intersticial. Fase subaguda de la PPA. H-E. 100x

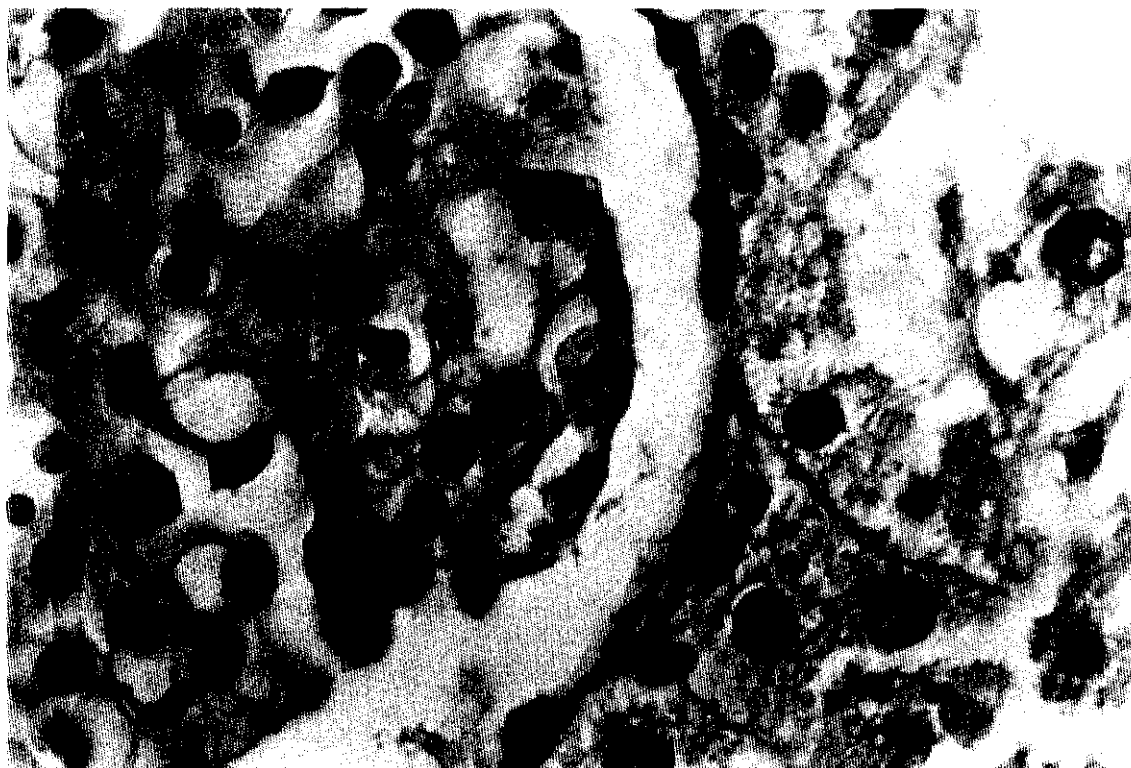


Foto 4.- Trombo hialino en capilar glomerular. Fase subaguda de PPA. H-E. 1000x



Foto 5.- Marcada hiperplasia de formaciones linfoides en pulmón. PPA crónica. H-E. 100x

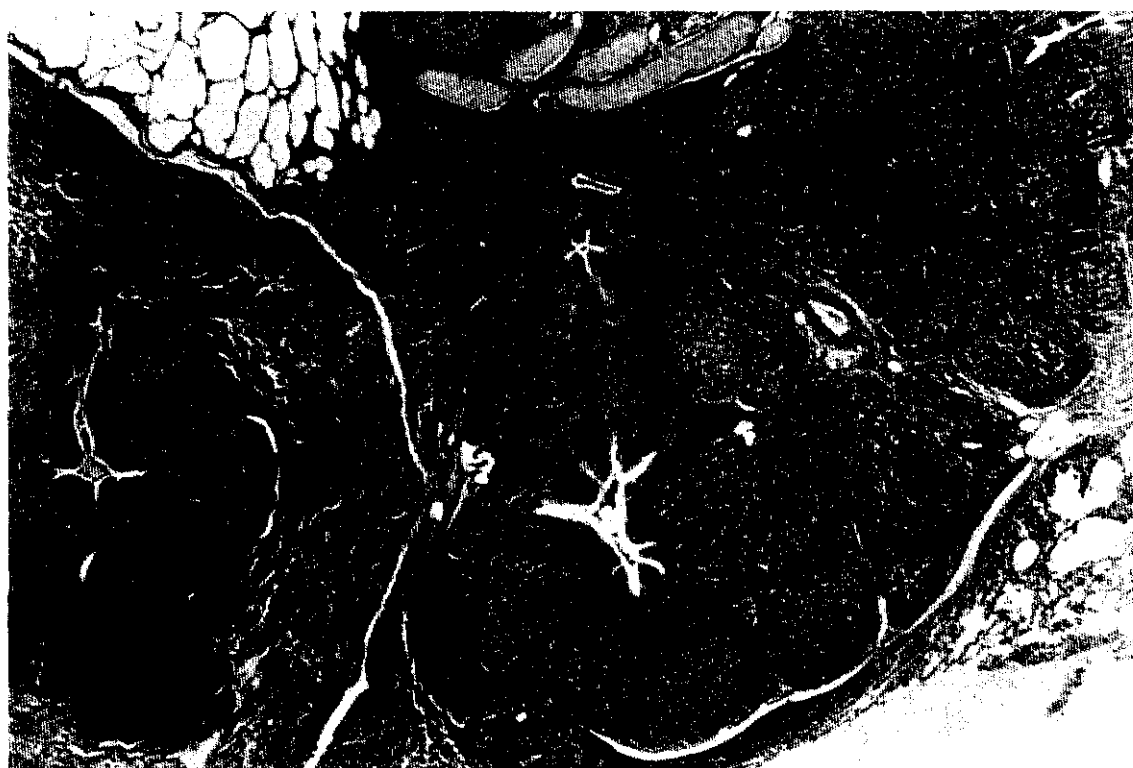


Foto 6.- Neumonía intersticial linfocitaria con hiperplasia del BALT. PPA crónica. H-E. 25x

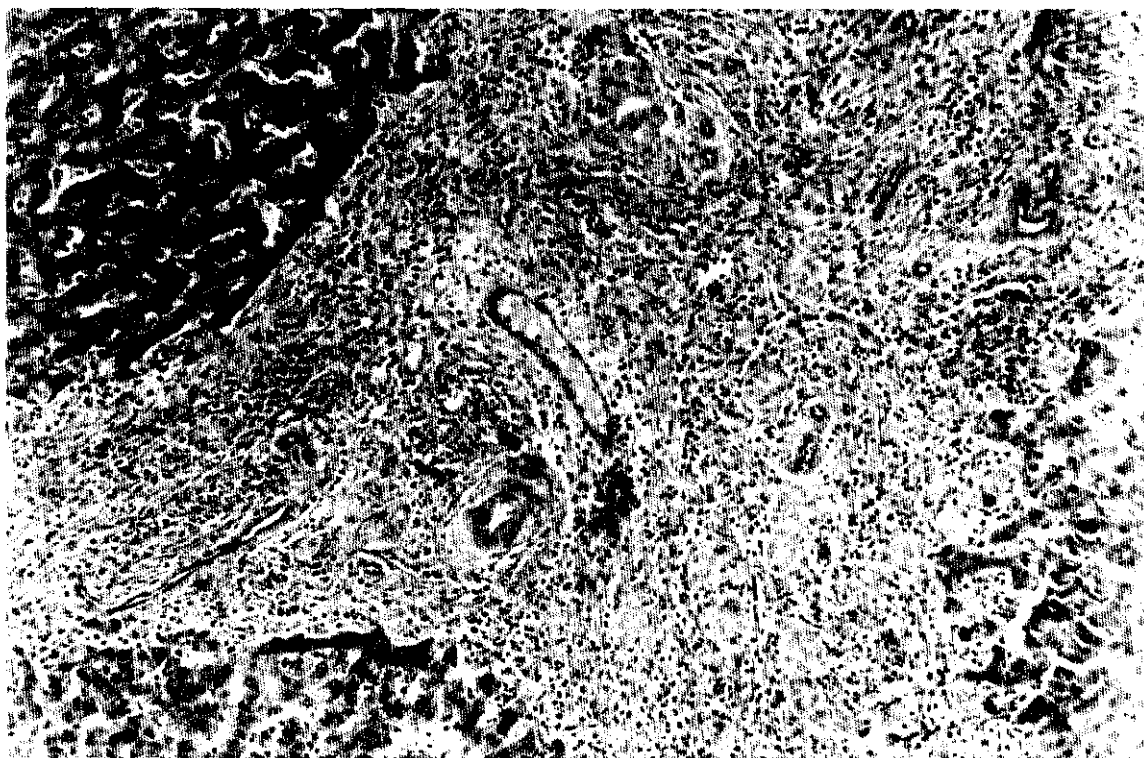


Foto 7.- Hepatitis vírica con fibrosis e hiperplasia de conductos biliares. PPA crónica. Tricrómico de Masson. 100x.

1.C.- Análisis de parámetros de infección.-

1.C.1.- Evolución del título de virus en sangre periférica.-

En todos los animales en los que se detectó la presencia de virus en sangre periférica se presentó un título más elevado entre los días 7 y 9 postinfección. En dos animales se detectó virus en sangre periférica desde el día 5 postinfección, aunque en un título bastante bajo (<10) (tabla 2).

El título de viremia alcanzado durante la infección influyó en el desarrollo de la enfermedad, presentando fases clínicas más graves los cerdos con mayor título.

En los cerdos que evolucionaron a formas crónicas el virus se detectó en sangre al menos hasta el día 36 postinfección.

Tabla 2.- Título de virus en sangre periférica.

(Las viremias se expresan el logaritmo decimal de la dilución máxima de un coágulo macerado cuya inoculación desarrolla efecto citopático en el 50% de los cultivos de leucocitos).

	Día 2	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 16
Cerdo 1	-	<1	6,35	6,69		
Cerdo 2	-	-	6,02	6,19	4,35	4,35
Cerdo 3	-	-	5,02	4,19	3,69	3,69
Cerdo 4	-	<1	5,19	4,35	4,35	4,35
Cerdo 5	-	-	5,02	5,19	5,02	5,02
Cerdo 6	-	-	-	-	-	-
Cerdo 7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cerdo 8	-	-	-	-	-	-
Cerdo 9	nd	nd	nd	nd	nd	nd

1.C.2.- Expresión de proteínas víricas en células de cerdos infectados.-

El anticuerpo monoclonal 174F11.8 reconoce un epítipo de la proteína vírica p30 inducida en la membrana de las células infectadas (Alcaraz *et al*, 1989). Utilizamos este anticuerpo monoclonal para analizar, mediante citometría de flujo, las poblaciones celulares infectadas en sangre periférica de cerdos inoculados con aislados atenuado y virulento del VPPA.

El análisis mediante citometría de flujo a diferentes días postinfección, del doble marcaje fluorescente con los anticuerpos monoclonales 174F11.8 y 74-22-15 (anti-SWC₃), demostró expresión de p30 fundamentalmente en la población de monocitos/macrófagos (fig. 2). Además, un porcentaje menor de granulocitos también expresó esta proteína durante la infección, lo cual permitió cuantificar la proporción de células infectadas a lo largo del proceso.

Esta metodología permitió la cuantificación de las fluctuaciones de los porcentajes de células infectadas durante la viremia, que oscilaron entre un 2 y un 30% de la fracción de células susceptibles. La máxima expresión se alcanzó entre los días 7 y 9 postinfección, en los cerdos infectados con el aislado atenuado; y en el día 5 en el grupo infectado con el aislado virulento. Esta expresión presentó una buena correlación con los títulos de virus en sangre. No se observó expresión de esta proteína o bien ésta fue muy baja en los animales en los que no pudimos detectar virus en sangre (tabla 3).

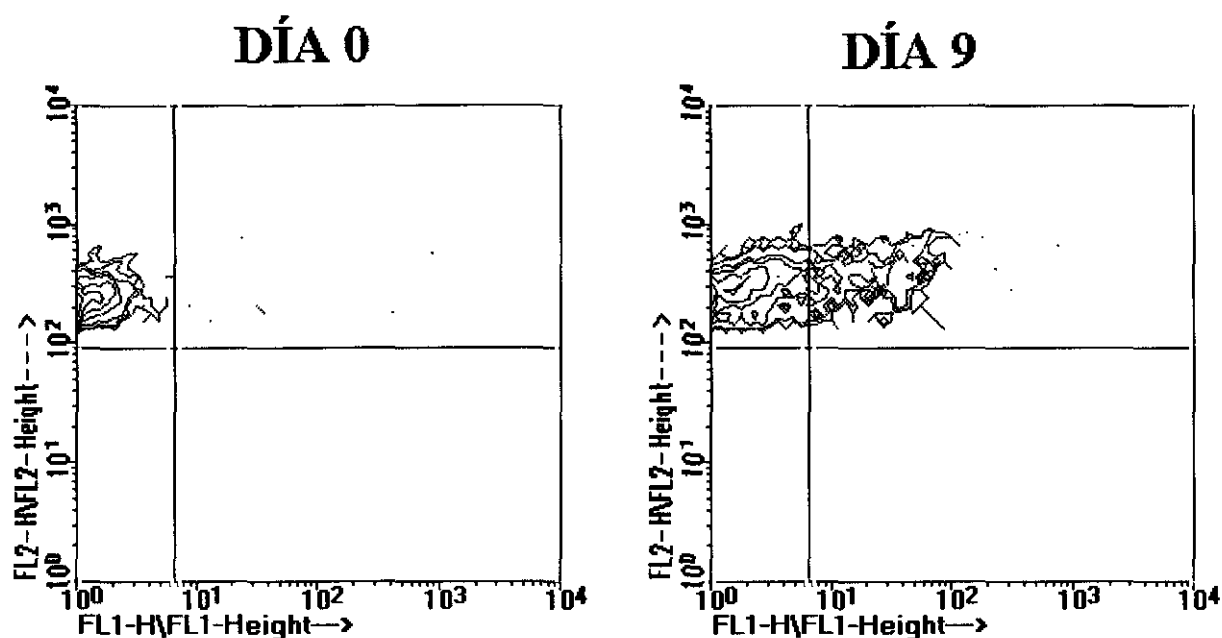


Fig. 2.-Representación en dos dimensiones del doble marcaje fluorescente obtenido por citometría de flujo. Eje de las X anti-p30 (FL1-H), eje de las Y anti-SWC₃ (FL2-H). Las células dobles positivas aparecen en el cuadrante superior derecho.

Tabla 3.- Porcentaje de expresión de p30 en población de mononucleares 74-22-15 positivas.

	Día 0	Día 2	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 14	Día 16
Cerdo 1	1,45	0,98	1,38	17,0	32,8			
Cerdo 2	0,97	5,08	3,02	5,78	12,3	4,25	nd	6,96
Cerdo 3	0,95	0,95	nd	15,45	2,82	0,69	nd	7,09
Cerdo 4	2,22	5,14	3,79	3,74	3,55	0,90	nd	2,27
Cerdo 5	2,62	2,14	2,35	3,90	8,93	1,63	nd	3,55
Cerdo 6	nd	5,46	4,76	3,39	5,42	6,66	5,40	4,61
Cerdo 8	4,21	4,28	4,43	2,46	1,85	4,42	5,51	4,95

1.D.- Anticuerpos durante la infección experimental. Efecto neutralizante.-

El título de anticuerpos desarrollado durante la infección no pudo determinarse adecuadamente mediante la técnica de ELISA, debido a que varios cerdos no presentaron reacción positiva por esta técnica y sí por otras como la IFI o el inmunoblot (determinada en el laboratorio del Dr. J.M. Escribano). Por lo tanto la titulación se determinó mediante la técnica de IFI.

El título de anticuerpos presentó una evolución creciente desde el día 5, en que fueron detectados en bajo título hasta que se estabilizaron en cerdos crónicos hacia los 3 meses postinfección (fig. 3).

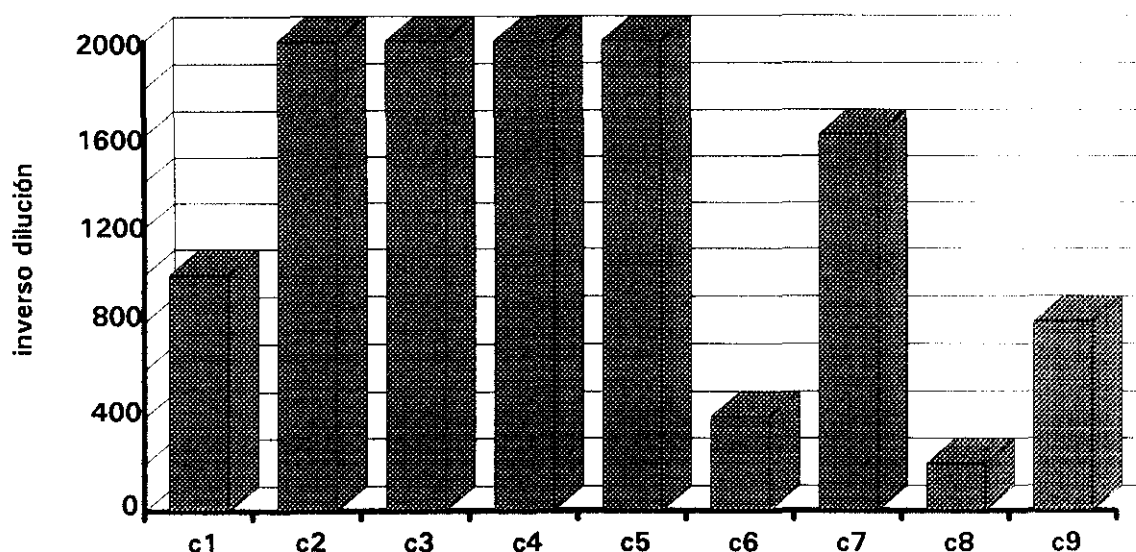


Fig. 3.- Título de anticuerpos hasta los 16 días postinfección. Las barras representan el inverso de la dilución máxima del antisuero observada como positiva tras el análisis de la fluorescencia indirecta. En los cerdos 6 y 8 no se detectó virus en sangre periférica.

No se observó ninguna correlación aparente entre el título de anticuerpos desarrollado y la evolución clínica de la enfermedad, pues animales con bajo título apenas desarrollaron sintomatología (cerdos 6 y 8) y otros con un título bastante elevado presentaron una forma clínica lo suficientemente intensa como para provocar su muerte (cerdos 2 y 3).

Se valoró el efecto neutralizante de los anticuerpos desarrollados durante la infección en cultivos de células Vero frente a aislados formadores de placas tanto atenuados como virulentos. Pudimos observar un claro efecto neutralizante a diluciones bajas de los diferentes antisueros, aún siendo virus diferentes a los que causaron la enfermedad experimental. Los anticuerpos neutralizantes se detectaron a partir del día 7 postinfección, alcanzado un título máximo de neutralización en el día 14 postinoculación. El título máximo alcanzado nunca fue del 100% (salvo en un caso), quedando una pequeña proporción de virus sin neutralizar (fig. 4).

Este efecto neutralizante no fue observado frente a aislados de alto pase en cultivos (aislados más atenuados). Otros autores han descrito un efecto neutralizante de los anticuerpos de cerdos supervivientes a una infección experimental (Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1986a; Zsak *et al*, 1993).

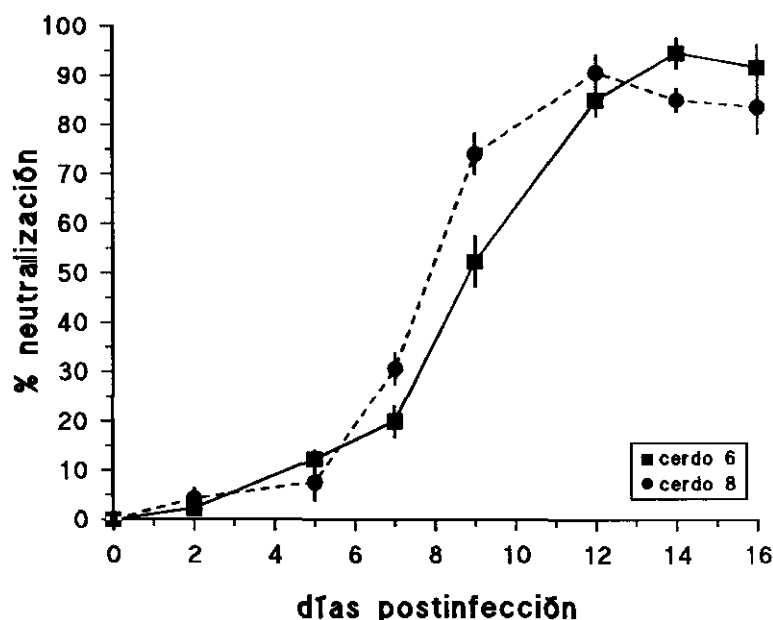


Fig. 4.- Ejemplos de la cinética de anticuerpos neutralizantes desarrollada durante la infección con el virus atenuado E75CV₁-4.

1.E.- Valores hematológicos.-

1.E.1.- Recuentos globales de leucocitos.-

Desde el primer momento se observó un descenso del recuento total de leucocitos (leucopenia), que alcanzó un mínimo significativo ($p < 0,01$) durante el día 7 postinoculación. En este momento los valores fueron un 47,98% inferiores a los valores basales.

Posteriormente las cifras retornaron hacia valores basales, siendo moderadamente superiores a éstos en el día 16 postinfección, con un incremento del 7,69% respecto al día cero (fig. 5).

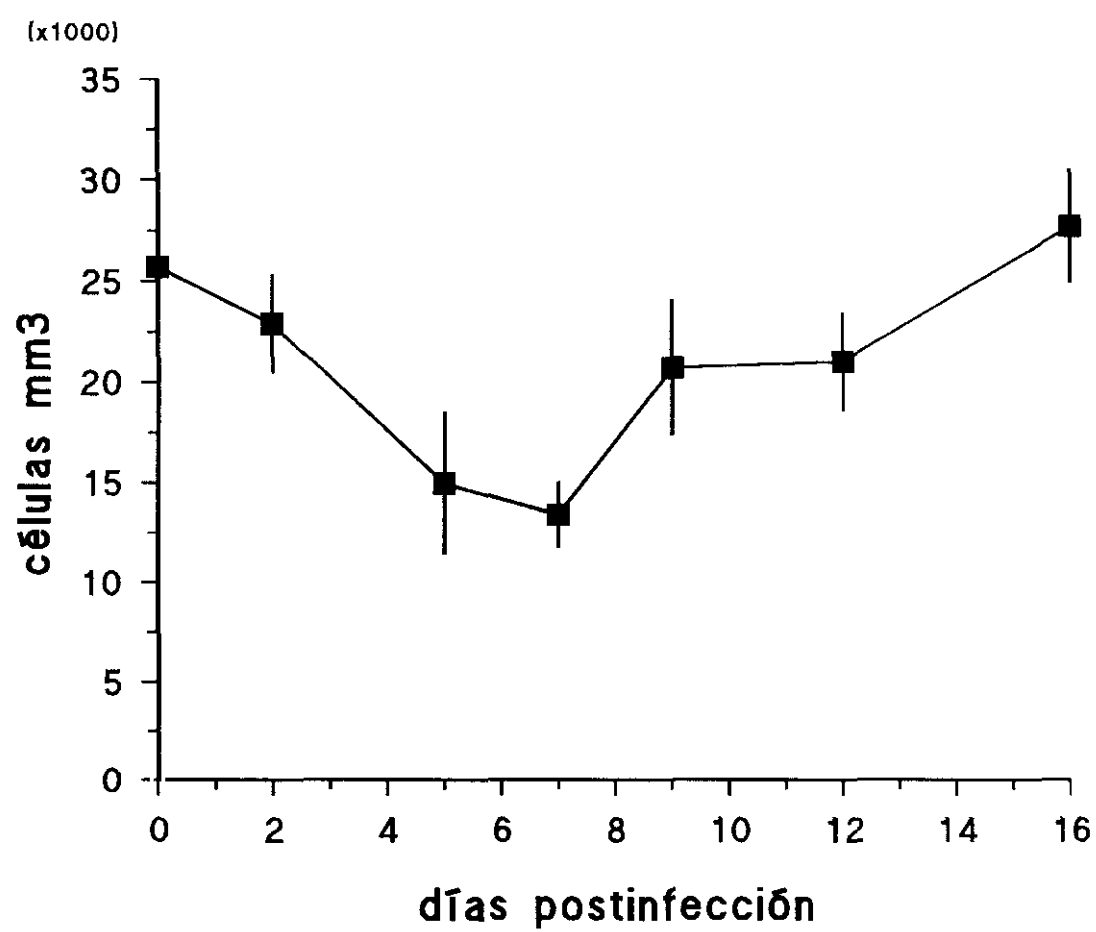


Fig. 5.- Recuento total de leucocitos en cerdos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4. Los valores se expresan en miles de células/mm³ de sangre.

1.E.2.- Recuentos diferenciales de leucocitos. Células inmaduras.-

Con la infección aparece leucopenia con linfopenia y neutrofilia, junto con un incremento de las formas inmaduras en sangre periférica.

Coincidiendo con la leucopenia durante la primera semana postinfección, hemos podido observar un desequilibrio en la proporción habitual de leucocitos, consistente en linfopenia y neutrofilia. Los neutrófilos alcanzaron un máximo porcentaje en el día 7 postinoculación. En el día 16 postinfección la proporción de linfocitos presentó un moderado incremento respecto a valores preinfección.

El porcentaje de monocitos se incrementó levemente en el día 2 postinoculación, con un máximo en el día 12.

Durante la infección se pudo apreciar un incremento de la presencia de neutrófilos jóvenes en sangre periférica, consecuencia de una mayor actividad de la médula ósea (fig. 6).

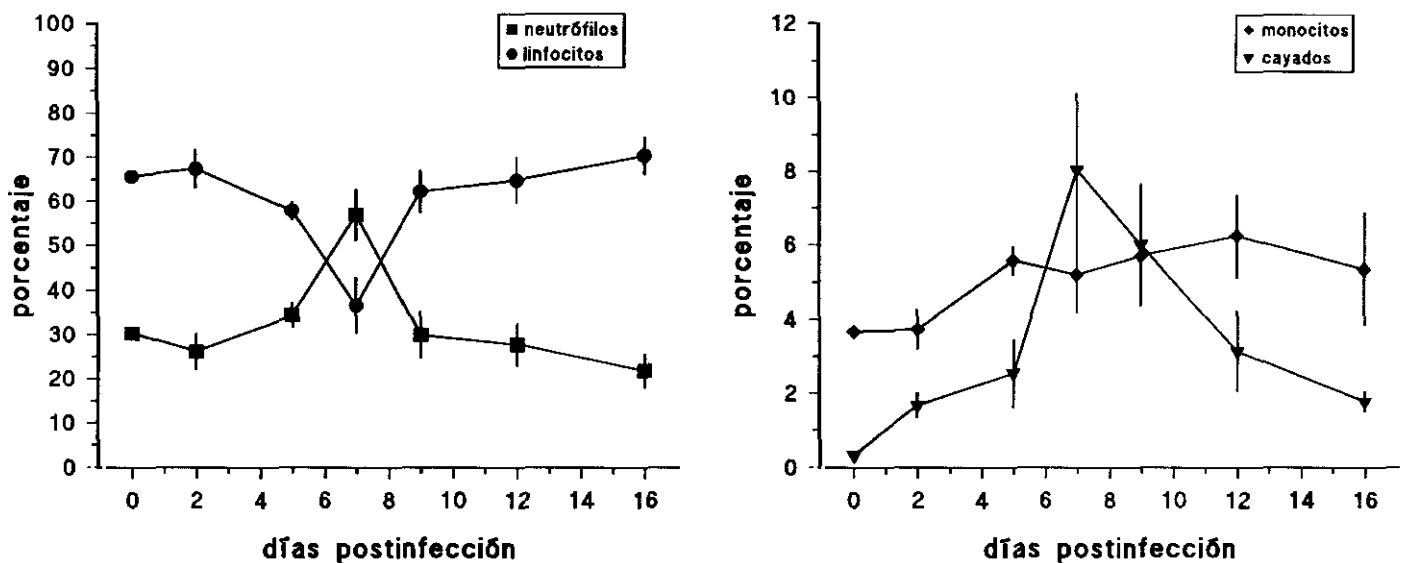


Fig. 6.- Recuento diferencial de leucocitos en cerdos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4.

1.F.- Poblaciones celulares de la respuesta inmune. Marcadores de activación.-

1.F.1.- Antígenos determinados en población de linfocitos

1.F.1.1.- Expresión del antígeno CD8 en linfocitos de sangre periférica.-

Se utilizaron ascitis purificadas del anticuerpo monoclonal 76-2-11 para la realización del marcaje fluorescente de las células CD8⁺.

Este antígeno se expresa de forma normal aproximadamente en un 40% de los linfocitos T de sangre periférica (Lunney y Pescovitz, 1987).

En los cerdos pertenecientes a este grupo experimental observamos un aumento significativo ($p < 0,02$) de la proporción de células CD8⁺ en la población de linfocitos entre los días 9 (45,45%) y 12 (42,8%) postinfección.

La intensidad de fluorescencia (determinada por el canal medio del histograma y que denota la cantidad de antígeno superficial por célula) presentó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el día 9 (34,85%) (fig. 7).

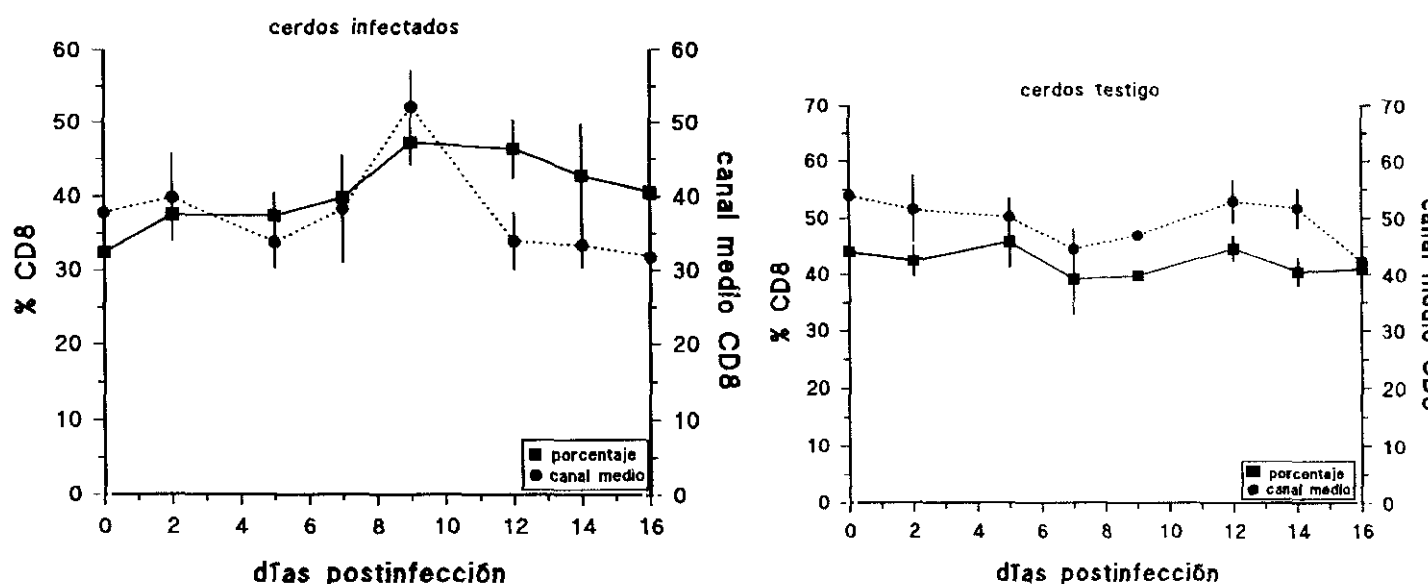


Fig. 7.- Porcentaje de células CD8⁺ y expresión media del antígeno en linfocitos de sangre periférica durante la infección con el aislado atenuado E75CV₁-4.

El estudio de dobles marcajes SLA-II-CD8 mostraba que el aumento en la proporción de CD8⁺ se acompañaba de un aumento en la expresión de SLA-II de esas células a lo largo de la infección.

Teniendo en cuenta que, como se describe en capítulos siguientes, la expresión del receptor de IL-2 disminuyó de forma característica durante la infección. También se evaluó la expresión conjunta en células linfocitarias de los antígenos CD8-receptor de IL-2, pudiendo observar un descenso entre los días 8-12 postinfección, momento durante el cual parece existir una mayor estimulación antigénica por la elevada viremia. Esta expresión retornó a la normalidad hacia la 3^a semana.

1.F.1.2.- Expresión del antígeno CD4 en linfocitos de sangre periférica.-

La valoración de este antígeno se realizó utilizando ascitis purificadas del anticuerpo monoclonal 74-12-4. Este antígeno se expresa normalmente en un 25-30% de los linfocitos T de sangre periférica. El histograma de fluorescencia definido por citometría de flujo presenta dos poblaciones bien diferenciadas, una positiva y otra negativa.

Durante la infección con el virus atenuado E75CV₁-4 se observó un aumento de la proporción de linfocitos CD4⁺ entre los días 9 y 12 (37,75%↑) postinoculación.

Sin embargo, la fluorescencia media de estas células disminuyó entre los días 5 y 7 (46,76%↓) postinfección, con un mínimo en el día 16 (48,2%↓) (fig. 8).

El estudio del doble marcaje receptor de IL-2-CD4 manifestó un descenso progresivo durante las dos primeras semanas postinfección.

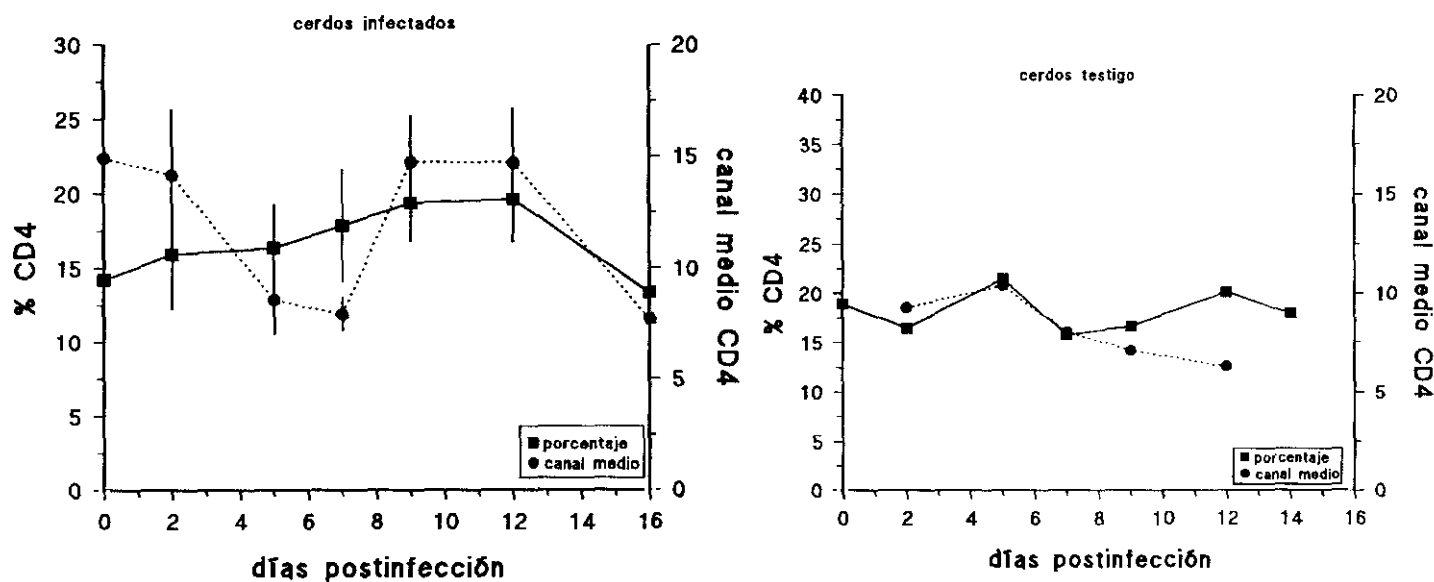


Fig. 8.- Proporción de células $CD4^+$ y fluorescencia media del antígeno en linfocitos de sangre periférica durante la infección con el aislado atenuado E75CV₁-4.

1.F.1.3.- Células dobles positivas CD4-CD8 en sangre periférica.-

La función de estas células en sangre periférica no está aún bien establecida. Algunos autores las consideran como células de actividad citotóxica en porcino (Pescovitz *et al*, 1984) o como células de actividad supresora en el hombre (Lunney y Pescovitz, 1988). Trabajos más recientes parecen indicar que dentro de esta población extratímica se engloban linfocitos T colaboradores estimulados y diferenciados como linfocitos memoria específicos de antígeno (Pescovitz *et al*, 1994).

En el cerdo, en condiciones normales, aparecen entre un 8-68% de células dobles positivas en linfocitos T circulantes (no adherentes a lana de nylon) (Pescovitz *et al*, 1994), aumentando su proporción con la edad de los animales. Proporciones tan elevadas de estas células sólo se encuentra en condiciones patológicas en el hombre (Lunney y Pescovitz, 1987).

Cuando se analizan mediante diagramas de fluorescencia de dos dimensiones, estas células dobles positivas aparecen agrupadas entre las células CD8⁺ de intensidad media de fluorescencia (fig. 9).

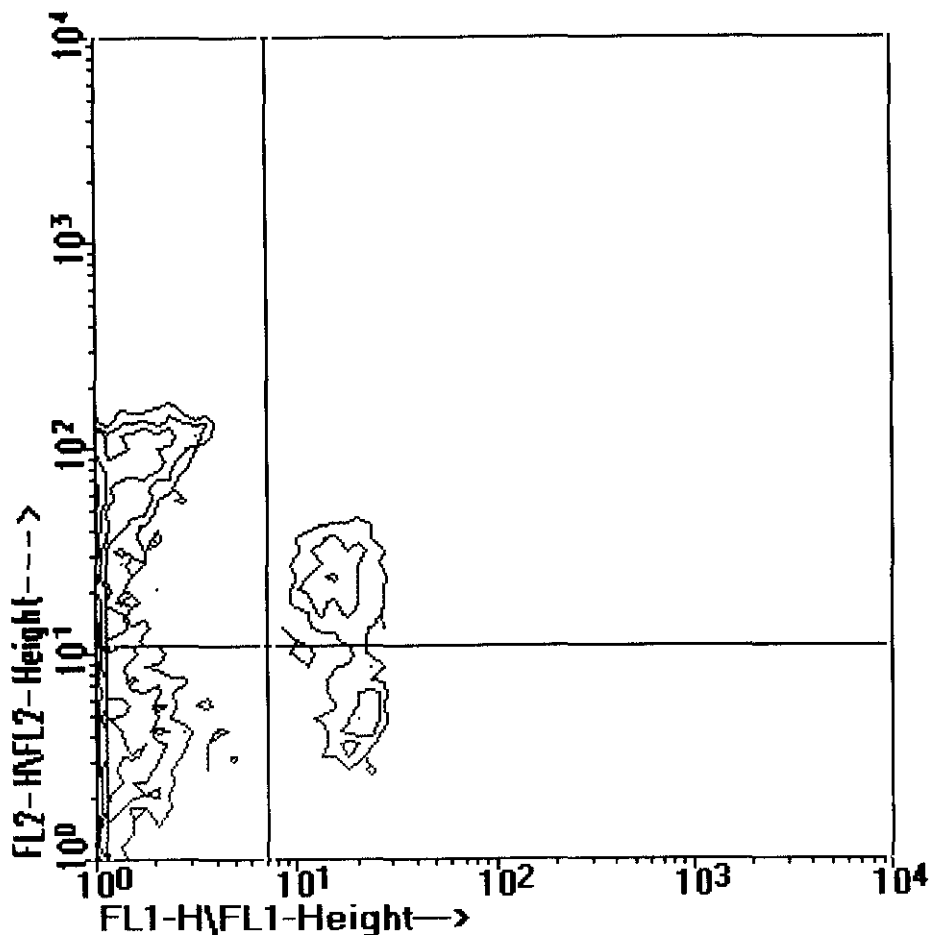


Fig. 9.- Representación en dos dimensiones de las células CD4⁺CD8⁺. Estas células dobles positivas aparecen en el cuadrante superior derecho. En el eje de las X se representa la fluorescencia obtenida con el anticuerpo frente a CD4 y en el eje de las Y la presentada con el anticuerpo frente a CD8.

A lo largo de nuestro desarrollo experimental se observó una proporción bastante uniforme de células dobles positivas $CD4^+CD8^+$ en la población de linfocitos, hasta el día 16 postinfección, al final del desarrollo experimental, momento en el cual se observó una disminución del 49% respecto a los valores iniciales (fig. 10).

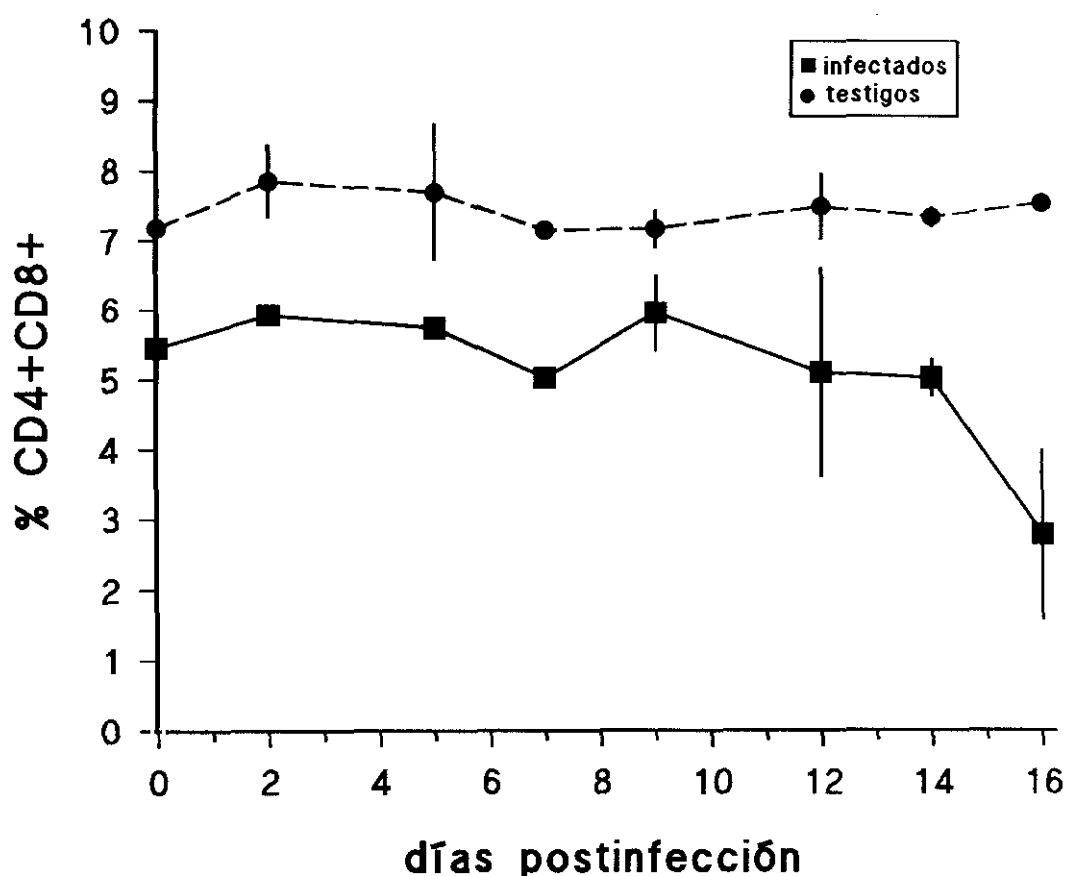


Fig. 10.- Variaciones en la proporción de linfocitos $CD4^+CD8^+$ a lo largo de la infección con el aislado atenuado E75CV₁-4 del VPPA.

1.F.1.4.- Expresión del receptor de IL-2 en linfocitos de sangre periférica.-

Se valoró la intensidad media de fluorescencia de los linfocitos para el antígeno CD25, fracción α del receptor de membrana de la IL-2, mediante ascitis purificadas del anticuerpo monoclonal K231-3B2. La expresión de este antígeno aumenta tras la activación de los linfocitos y se regula mediante estimulación autocrina con la IL-2 que ellos mismos producen.

En los linfocitos de sangre periférica de los animales incluidos en nuestro desarrollo experimental, la fluorescencia media del receptor de IL-2 disminuyó a lo largo de la infección. Este descenso fue significativo en todos los puntos tomados a partir del día 5 postinoculación ($p < 0,05$), alcanzando el mínimo en el día 14 con valores un 82,42% inferiores a las cifras iniciales.

En los animales con infección crónica se ha observado una recuperación de la expresión antigénica del receptor de IL-2 que tiende incluso a superar los niveles de expresión basal a partir de la tercera semana postinfección (21,4% ↑) (fig. 11).

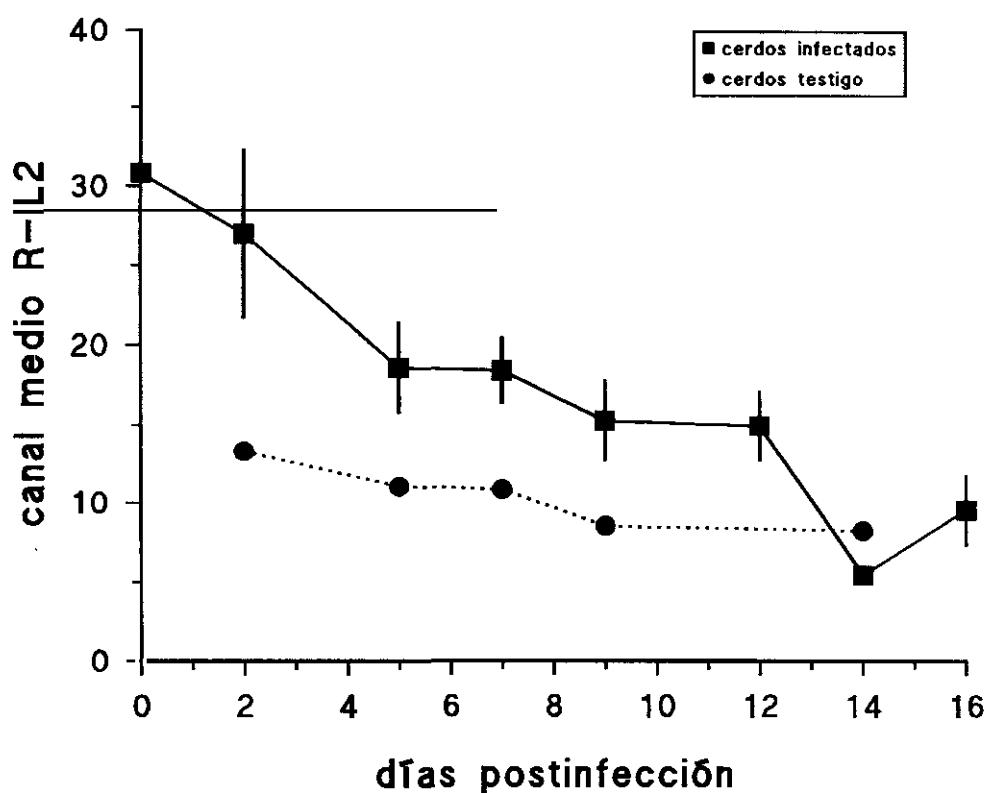


Fig. 11.- Fluorescencia media del antígeno CD25 (receptor de IL-2) en linfocitos periféricos de cerdos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4.

1.F.1.5.- Linfocitos B en sangre periférica.-

Para caracterización de esta población celular la se utilizaron sobrenadantes de

cultivos celulares de clones productores del anticuerpo monoclonal 5C9. Este anticuerpo es específico frente al antígeno de superficie IgM, que aparece en la membrana plasmática de la mayoría de los linfocitos B maduros (Roitt, 1992; Tizard, 1992).

El histograma de fluorescencia característico de este anticuerpo es heterogéneo con ninguna subpoblación claramente definida dentro de la población de linfocitos.

En los cerdos estudiados en nuestro experimento se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) de la proporción de células B en la población linfocitaria de sangre periférica durante el día 7 postinfección (91% ↑). La fluorescencia media manifestada por estas células fue también significativamente mayor a los valores iniciales en este momento ($p < 0,05$) (70% ↑). Posteriormente su porcentaje disminuyó alcanzando un mínimo en el día 16 postinoculación, junto a una expresión media significativamente mínima ($p < 0,01$) con una disminución de un 49% respecto a los valores iniciales (fig. 12).

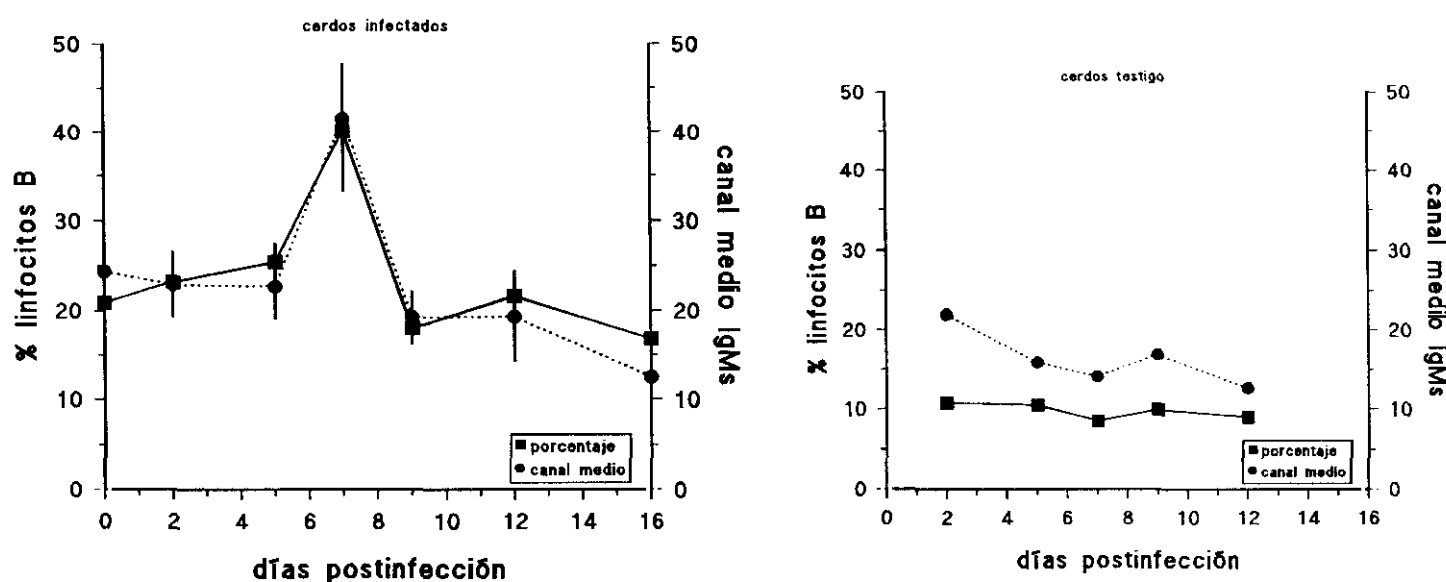


Fig 12.- Variaciones en la proporción de células B y expresión media del antígeno IgM en linfocitos de sangre periférica durante la infección con el aislado E75CV₁-4.

1.F.2.- Antígenos determinados en población de células mononucleares.

1.F.2.1.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-I o SLA-I.

Ascitis purificadas del anticuerpo monoclonal 74-11-10 se utilizaron para valorar la expresión de este antígeno. El histograma de fluorescencia habitual ofrece un solo pico que incluye la práctica totalidad de la población celular de sangre periférica.

En los animales infectados observamos un aumento de la fluorescencia media (cantidad de antígeno presente en células positivas) en el día 7 postinfección ($p=0,09$), en células mononucleares. Este aumento fue de un 113,13% mayor que la expresión antigénica inicial. Conforme evolucionó la enfermedad la expresión disminuyó hasta un mínimo significativo ($p<0,05$) en el día 16 postinoculación (26,76%↓) (fig. 13).

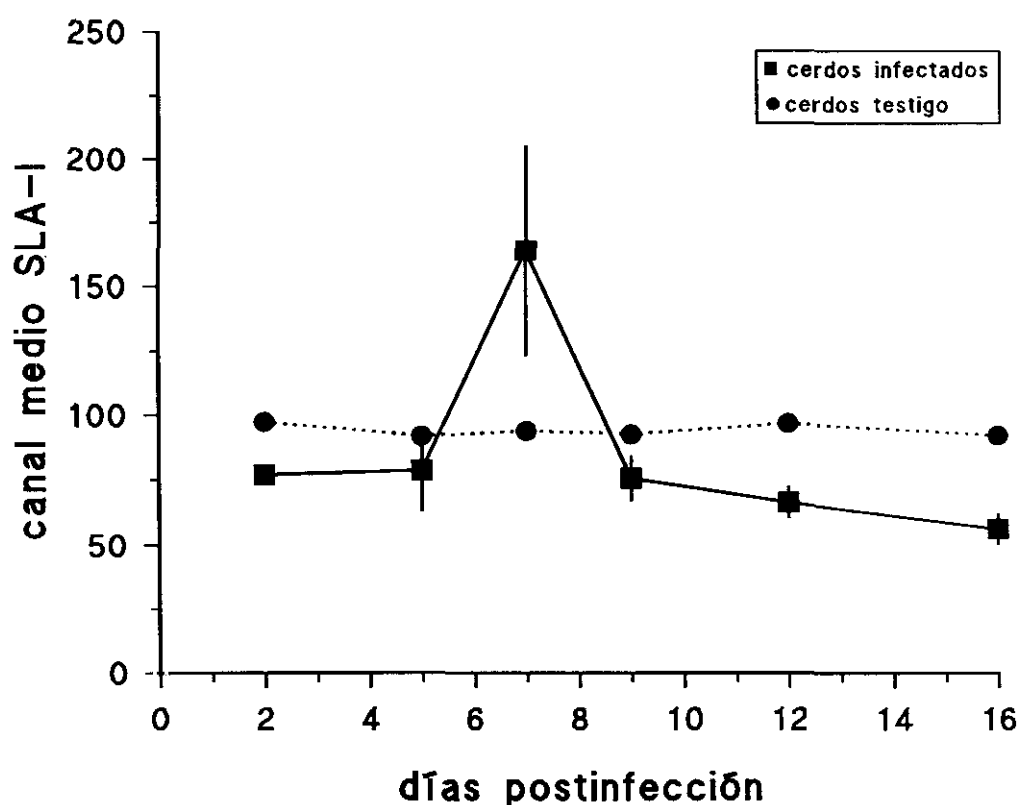


Fig. 13.- Variaciones en la fluorescencia media obtenida con el anticuerpo 74-11-10 (anti SLA-I) en células mononucleares de sangre periférica en la infección con el VPPA atenuado.

Cuando se realizó un estudio de la fluorescencia media en leucocitos de cerdos con infección crónica, apreciamos una modulación en la expresión de este antígeno a partir del primer o segundo mes postinfección, ya que en los histogramas de fluorescencia observamos una diferenciación clara en dos o tres subpoblaciones de distinta intensidad de fluorescencia, correspondiendo la población de mayor intensidad a los linfocitos (fig. 14).

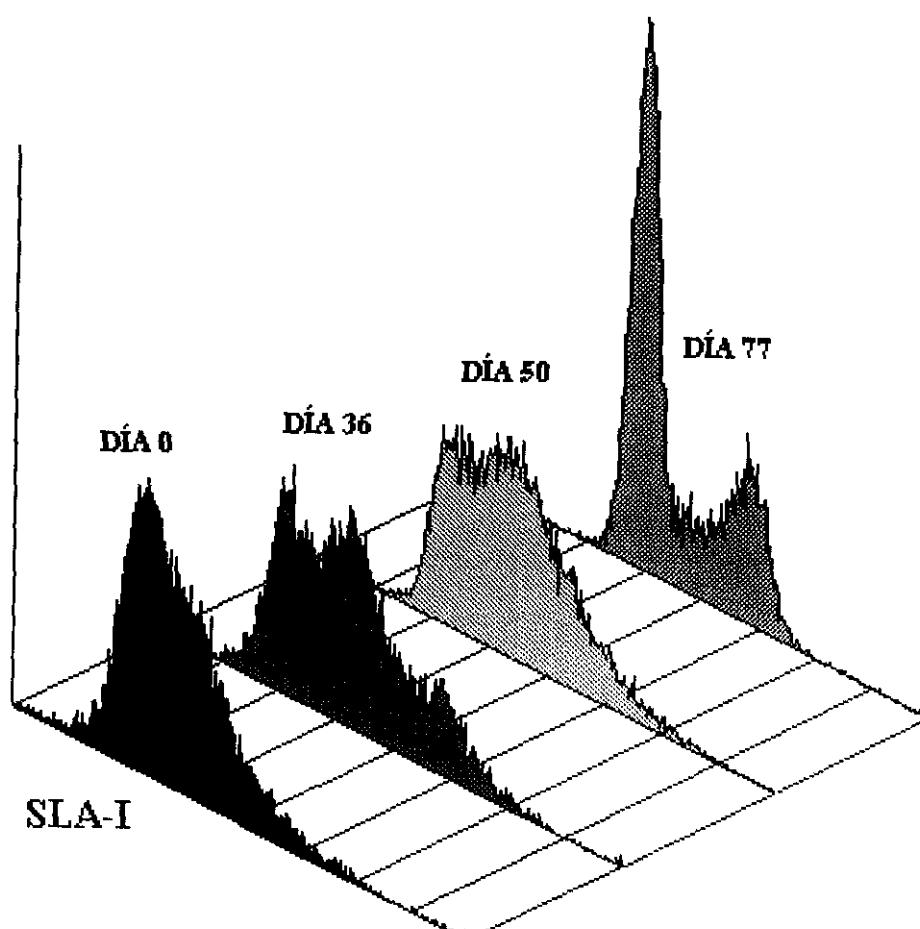


Fig. 14.- Modulación en la expresión del SLA-I. Ejemplo de la evolución del histograma de fluorescencia durante la infección crónica a diferentes días postinoculación. En el eje de las X se representa el valor FSC- tamaño celular; y en el eje de las Y se representa el valor SSC- complejidad celular.

1.F.2.2.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-II o SLA-II.

El estudio de este antígeno inmunitario se llevó a cabo tras marcar las células con el anticuerpo monoclonal purificado MSA₃. Este anticuerpo detecta la proteína codificada por el locus SLA-DRw del MHC-II, el antígeno de menor peso molecular de las proteínas que constituyen el SLA-II (Lunney y Pescovitz, 1987; 1988; Lunney, 1994).

En cerdos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4 se apreció un aumento significativo ($p < 0,02$) en la proporción de células mononucleares SLA-II⁺ durante el día 7 postinoculación (14,02% ↑). La proporción mínima de estas células fue observada en el día 16 (3,32% ↓).

Paralelamente a las variaciones en el porcentaje de células SLA-II⁺, la fluorescencia media de las células desarrolló una máxima expresión significativa ($p < 0,05$) en el día 7 postinfección (55,9% ↑). Hacia el final de la experiencia la modulación antigénica cambió su tendencia, con una disminución significativa de la fluorescencia media ($p < 0,02$) en el día 16 postinfección (31,3% ↓) (fig. 15).

Es decir, el SLA-II se expresaba con un máximo en la primera semana postinfección para modularse luego al final de la segunda semana, disminuyendo por debajo de los valores basales. Estas variaciones fueron más llamativas en la intensidad media de fluorescencia, aunque también ocurrieron en el porcentaje de células.

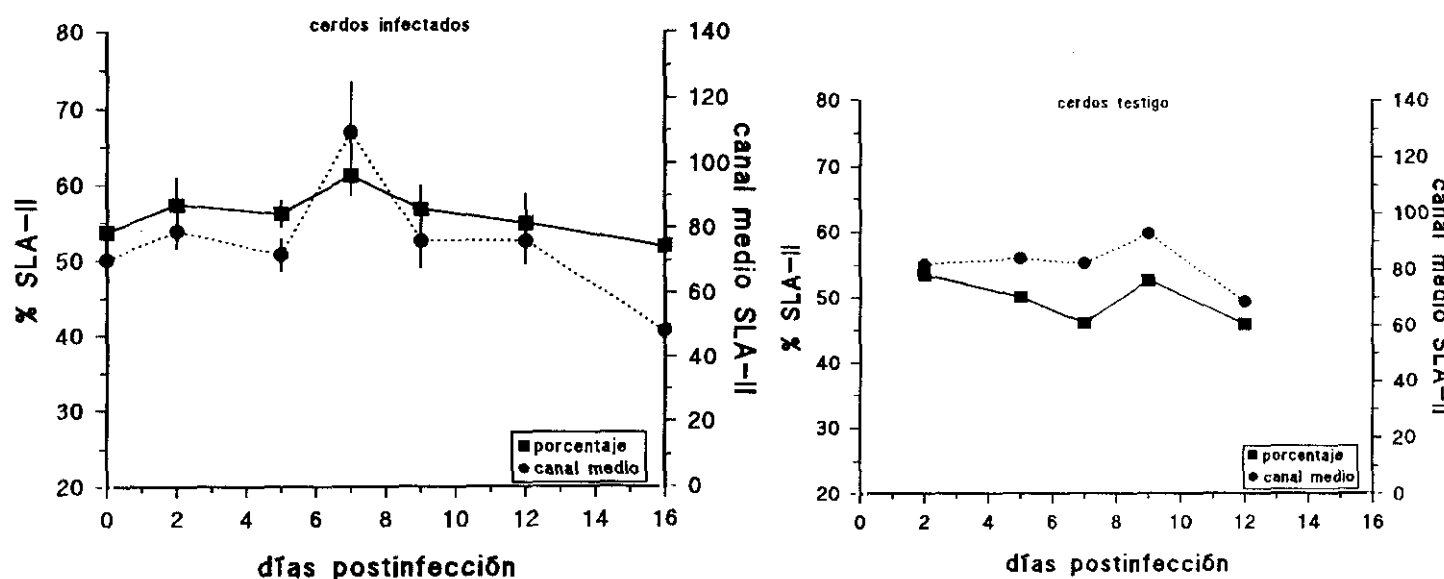


Fig. 15.- Porcentaje y fluorescencia media de células mononucleares $SLA-II^+$ en sangre periférica durante la infección con el aislado atenuado E75CV₁-4.

1.F.2.3.- Monocitos/macrófagos en sangre periférica.-

Esta población periférica resulta de gran interés debido a que el macrófago es la principal célula diana del virus y por la gran variedad de funciones inmunológicas que pueden desarrollar durante una infección vírica.

El anticuerpo monoclonal 74-22-15 detecta el antígeno SWC₃ presente en la mayor parte de los monocitos y granulocitos de sangre periférica. Utilizamos ascitis purificadas de dicho anticuerpo para el estudio de esta población periférica en células

mononucleares de cerdos infectados. El perfil normal de fluorescencia de los histogramas presenta dos poblaciones diferenciadas claramente dentro de las células mononucleares; una de ellas de alta intensidad de fluorescencia correspondiente a los monocitos y otra de intensidad nula correspondiente a los linfocitos.

Durante la infección experimental con el virus E75CV₁-4 atenuado se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) de la proporción periférica de monocitos en los días 5 y 7 (103,24% ↑), junto a otro aumento significativo en el día 12.

La intensidad media de fluorescencia presentó una tendencia similar, elevándose en los días 7 ($p < 0,05$; 73,1% ↑) y 12 postinfección (fig. 16).

Es decir, la infección con el virus se comportó como un estímulo para los monocitos/macrófagos periféricos, ya que aumentó la proporción de células y también la expresión antigénica de las mismas, sobre todo en los días 7 y 12 postinfección.

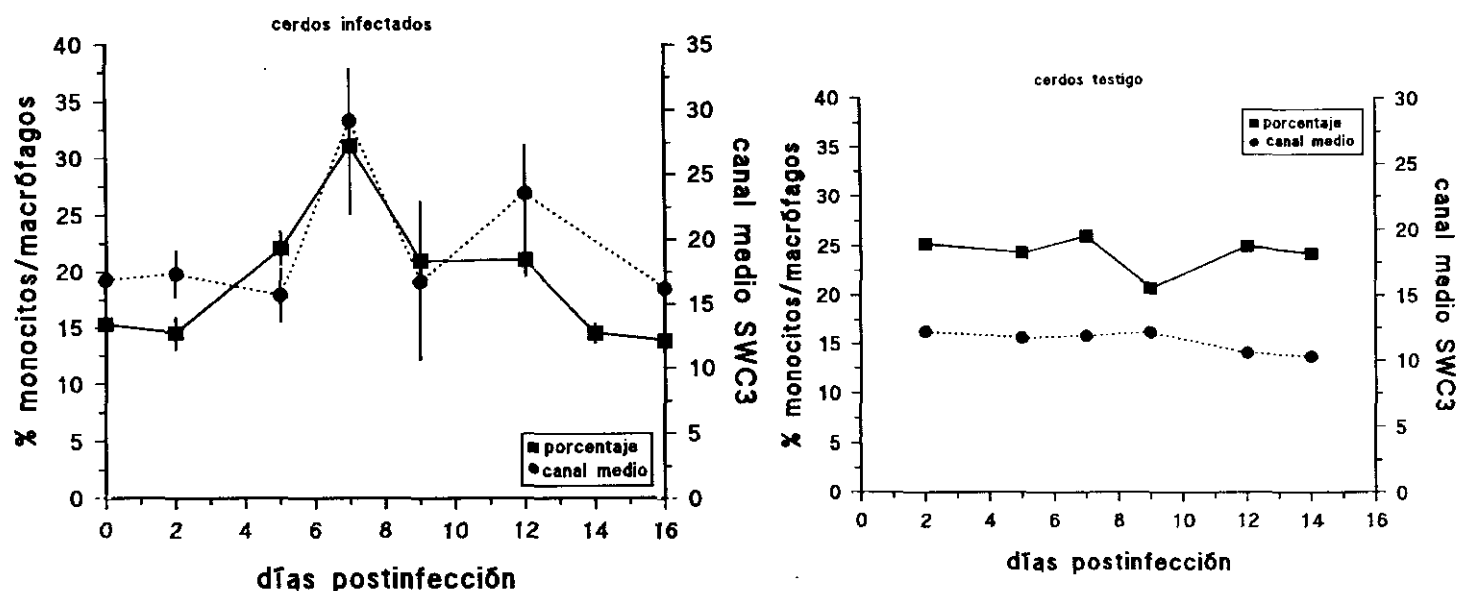


Fig. 16.- Proporción de células mononucleares SWC₃⁺ (monocitos/macrófagos) y expresión media del antígeno en células de sangre periférica durante la infección con el aislado E75CV₁-4.

De forma normal, aproximadamente un 50% de los monocitos de sangre periférica expresan SLA-II en su membrana (Lunney y Pescovitz, 1988). Cuando valoramos mediante doble marcaje esta expresión conjunta, en algunos de los animales problema, pudimos apreciar un incremento en la proporción de monocitos que expresaban SLA-II entre los días 7-12 postinfección, independientemente de que existiera o no un incremento del porcentaje circulante de monocitos.

2.- MODELO EXPERIMENTAL DEL VPPA VIRULENTO E70

2.A.- Curso de la infección. Formas clínicas. Temperatura.-

Los aislados virulentos de peste porcina africana cursan con cuadros muy agudos y elevada mortalidad (Montgomery, 1921; Konno *et al*, 1970; Villeda *et al*, 1993).

Con el aislado E70 virulento utilizamos la vía de inoculación intramuscular, ya que es la mejor caracterizada en este modelo vírico (Ruiz-Gonzalvo, comunicación personal; Sierra *et al*, 1990; Fernández *et al*, 1992).

La infección con este aislado evolucionó de forma muy rápida y a los dos días postinfección se empezaron a observar algunos síntomas iniciales como debilidad y apatía. A partir de esas primeras manifestaciones clínicas adquirió características mucho más graves muriendo los animales en la primera semana postinfección.

Los síntomas más llamativos fueron las alteraciones de la coagulación, con severas hemorragias o hematomas postsangría, incoagulabilidad de la sangre y eritemas cutáneos en zonas distales de la circulación orgánica (punta de la orejas y rabo), que posteriormente evolucionaron hacia necrosis (tabla 4).

Tabla 4.- Cuadro sintomático y curso de la enfermedad.

Animal/ Inóculo	Sintomatología	Desarrollo
Cerdo 6v/ 10³ DI₅₀	Tos paroxística (día 3). Pérdida de apetito, debilidad, eritemas cutáneos, disnea, melena, vómitos (días 4-7). Hipertermia (días 2-7).	VPPA aguda. Muerto día 7 pi
Cerdo 7v/ 10³ DI₅₀	Debilidad, apatía (día 2). Pérdida de apetito, vómitos, eritemas cutáneos (días 3-6). Hipertermia (días 3-6).	VPPA aguda. Muerto día 6 pi.

En los cerdos virulentos la hipertermia, desarrollada desde el día 2 postinfección, permanece hasta el momento de la muerte o sacrificio de los animales (fig. 17).

Al igual que lo observado en el modelo experimental atenuado, durante esas fases febriles se presentó un período virémico (ver apartado 2.C.1).

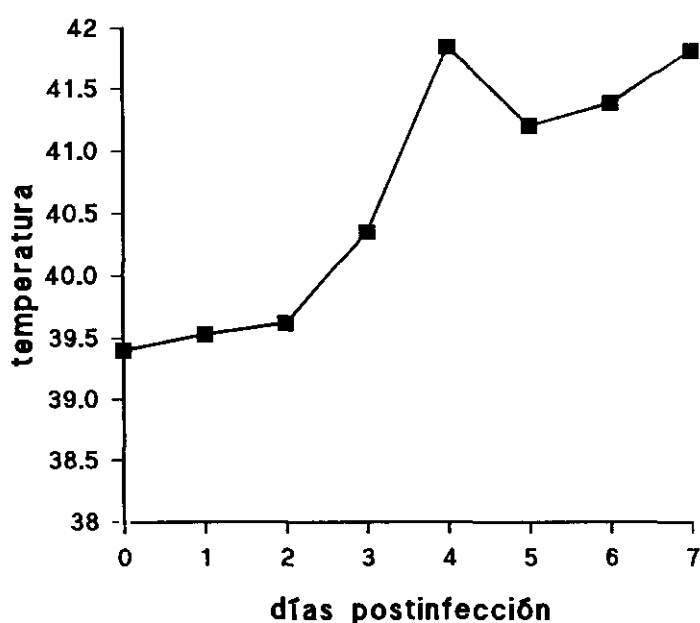


Fig. 17.- Evolución de la temperatura en cerdos infectados con el aislado virulento E70.

2.B.- Anatomía patológica.-

En la forma aguda de la Peste Porcina Africana destacan los fenómenos hemorrágicos, tras el desarrollo de graves desequilibrios en el sistema de coagulación que son características de esta enfermedad (Edwards *et al*, 1985; Villeda *et al*, 1993a). Las alteraciones de la función hemostática constituyen la causa principal de la mortalidad observada durante procesos agudos (Villeda *et al*, 1993a).

Macroscópicamente encontramos linfadenopatía necrótico-hemorrágica, hemorragias en corazón (subepicárdicas y subendocárdicas), riñón (pelvis y zona corticomedular), en mucosa del colon, neumonía lobulillar, congestión, edema traqueobronquial e hidrotórax. También se observó ascitis y hepatoesplenomegalia congestiva con cianosis.

Microscópicamente predominaban las necrosis y era frecuente observar figuras de degeneración y muerte celular, sobre todo en estructuras linfoides. Estas células presentaron morfología típica de células apoptóticas (ver apartado 3 de los Estudios *in vitro*).

En ganglios linfáticos observamos linfadenitis vírica necrotizante, con necrosis de localización centrofolicular característica y restos celulares, edema y hemorragias en los senos (foto 8). Se observó gran número de células blásticas inmaduras fundamentalmente en zonas interfoliculares. El bazo desarrolló esplenitis vírica, con marcada congestión, necrosis y pérdida de estructura tanto en pulpa roja como en pulpa blanca (foto 9). En las tonsilas la necrosis era más intensa en los senos linfáticos.

Los pulmones presentaban neumonía intersticial, localizada fundamentalmente en lóbulos apicales y medios, con exudado serofibrinoso en luces alveolares, edema intersticial, descamación, bronquiolitis con destrucción de músculo liso, y necrosis en áreas de tejido linfoide asociado a bronquiolos (BALT) (foto 10).

Se observaba hepatitis vírica constituida por focos de necrosis hepatocelular con depósitos hialinos, infiltrado sinusoidal, congestión y edema muy marcados y abundantes restos celulares en sinusoides (foto 11).

En los riñones destacaba la presencia de necrosis tubular aguda, hemorragias

subpiélicas e intersticiales, marcada congestión, presencia habitual de material proteináceo en intersticio y glomerulopatía mesangioproliferativa con ensanchamiento mesangial por el depósito de un material hialino (foto 12).

En el intestino se observó enteritis linfoplasmocitaria difusa, con necrosis apical de vellosidades.

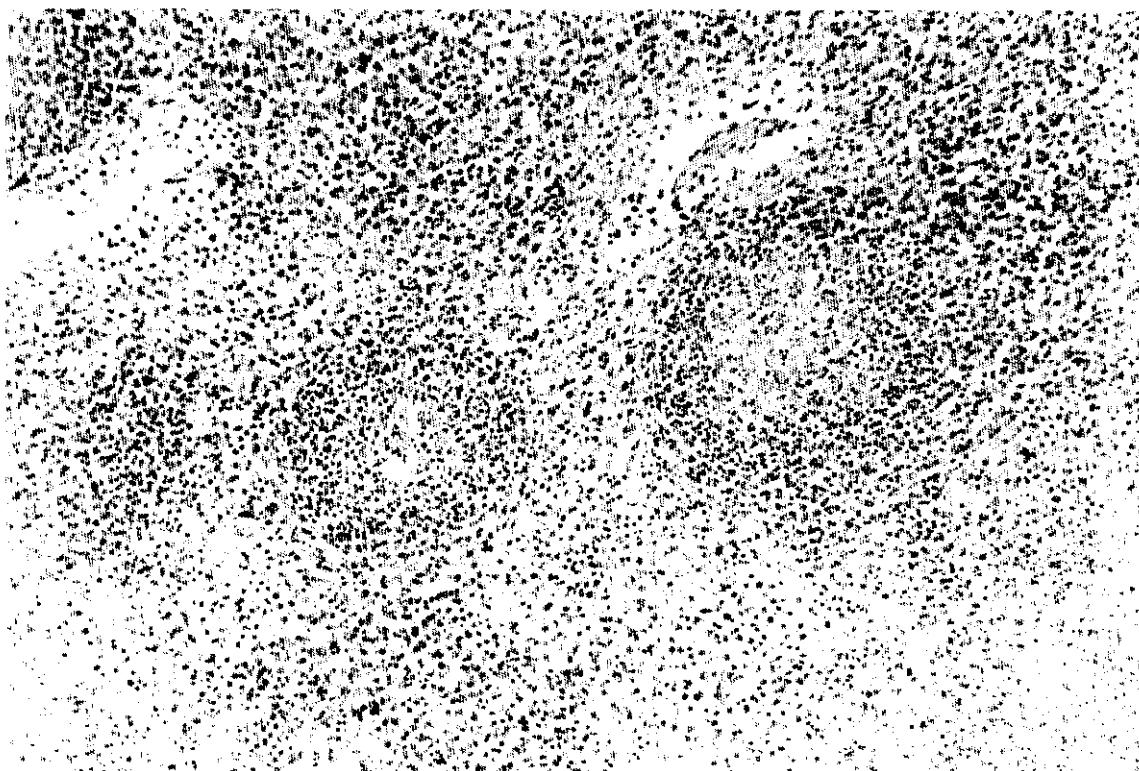


Foto 8.- Linfadenitis vírica con necrosis centrofolicular. PPA aguda. H-E. 100x.

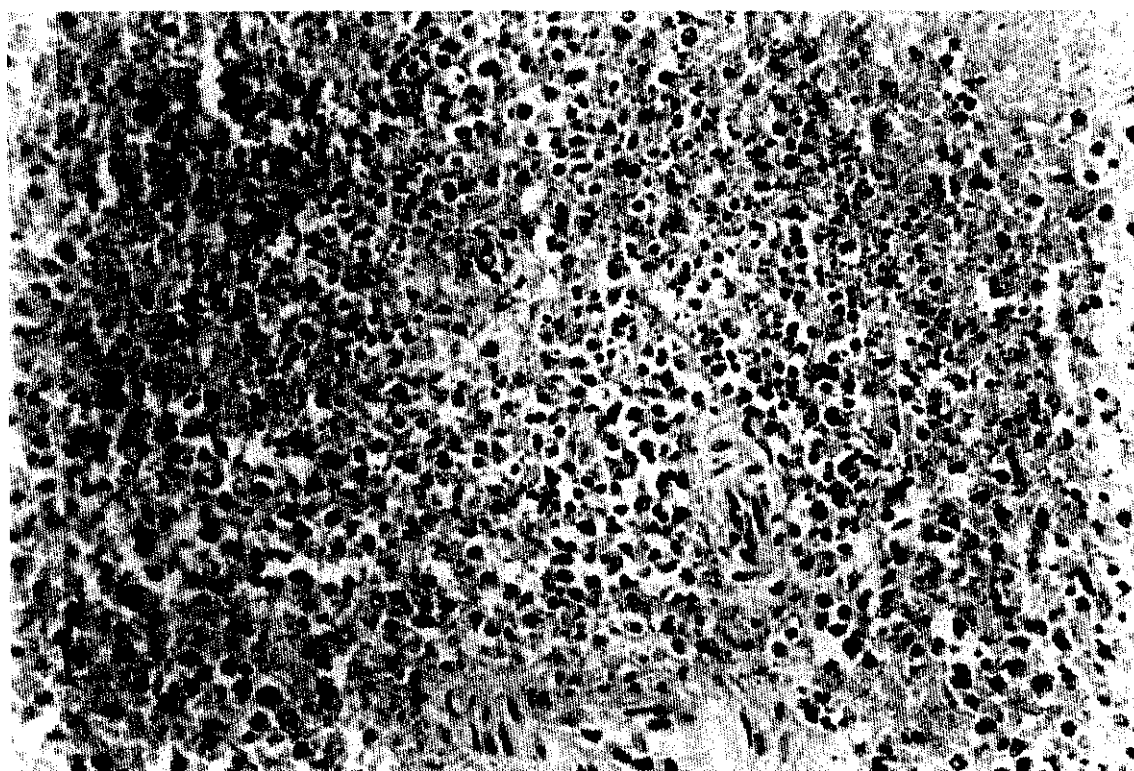


Foto 9.- Esplenitis vírica con necrosis de la pulpa blanca y marcada congestión. PPA aguda. H-E. 250x.



Foto 10.- Peribronquiolitis y edema alveolointersticial. PPA aguda. H-E. 198x. 100x.

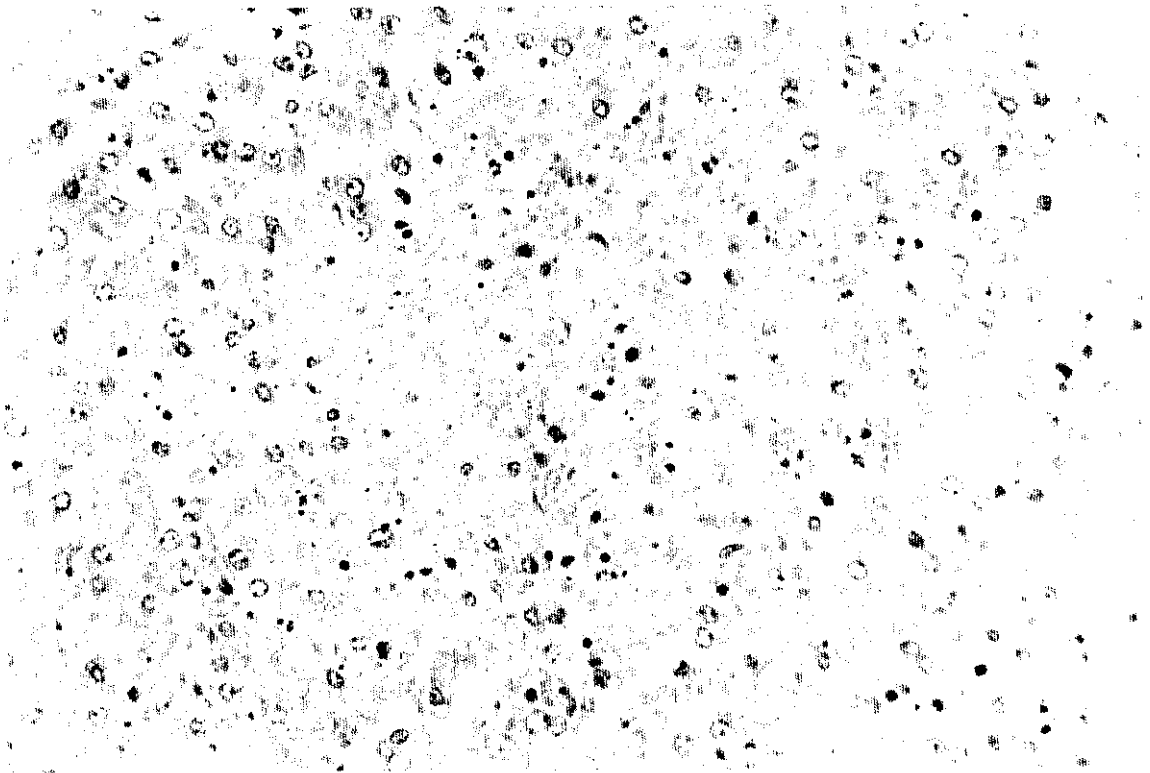


Foto 11.- Hepatitis vírica. Congestión de sinusoides y necrosis hepatocelular. PPA aguda. H-E. 250x.

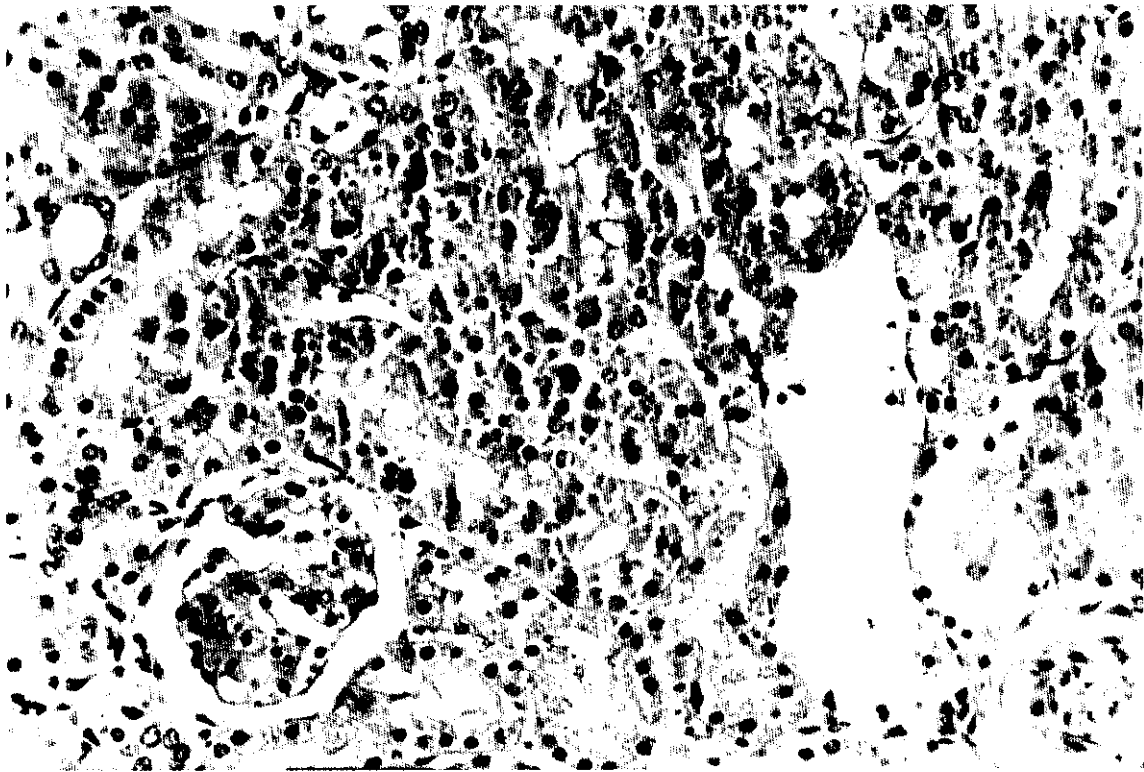


Foto 12.- Degeneración hialina y necrosis tubular. PPA aguda. H-E. 250x.

2.C- Análisis de parámetros de infección.-

2.C.1.- Evolución del título de virus en sangre periférica.-

Se detectó virus en sangre periférica a partir del día 5 postinoculación (no se analizaron días intermedios entre el día 2 y el día 5). En ese momento el valor del título de viremia fue máximo y cercano a 6 logaritmos decimales (fig. 18).

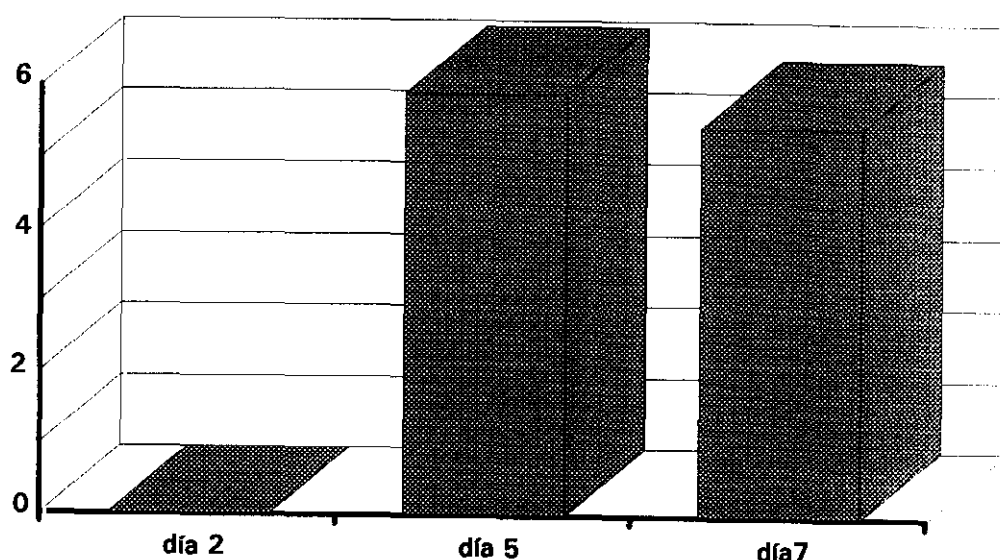


Fig. 18.- Título de viremia en sangre periférica tras la infección con el aislado virulento E70. Las barras representan el valor del logaritmo decimal de la dilución máxima del macerado en la que se observó efecto citopático en un 50% de los cultivos.

2.C.2.- Expresión de proteínas víricas en células de cerdos infectados.-

No se detectaron diferencias en las subpoblaciones que expresaron p30 en los cerdos inoculados con el aislado virulento respecto al atenuado, coincidiendo la mayor expresión de esta proteína con momentos de máxima viremia. Los porcentajes más

elevados de esta proteína se detectaron en días tempranos, antes que en los animales del grupo atenuado. Estos valores se correlacionaron bien con los títulos de viremia, siendo más elevada la expresión en el animal que falleció en el día 6 postinfección (tabla 5).

Tabla 5.- Porcentaje de expresión de p30 en células mononucleares 74-22-15 positivas.

	Día 0	Día 2	Día 5	Día 7
Cerdo 6v	4,19	3,12	14,99	11,47
Cerdo 7v	4,73	2,08	27,04	

2.C.3.- Distribución del virus en órganos de cerdos infectados.-

Previo al estudio inmunohistoquímico de diferentes órganos de los cerdos infectados se realizó una valoración del marcaje de diferentes anticuerpos frente al virus (anti-p30; anti-p54; anti-VPPA) en células Vero infectadas con el aislado E75CV₁-4.

Los patrones de distribución de positividad celular con los diferentes anticuerpos fueron los ya mencionados en trabajos previos (Alcaraz *et al*, 1989; Fernández *et al*, 1992b). La proteína temprana p30 presentó una distribución principal en membrana de las células infectadas y en algunas células difusa en el citoplasma (foto 13), pudiendo representar este último marcaje algunas fases del procesamiento proteico en el citoplasma, previa a su expresión en la membrana (Alcaraz *et al*, 1989; Afonso *et al*, 1992; Alcaraz *et al*, 1992). La proteína p54 presentó una distribución mayoritariamente

focal en los cuerpos de inclusión yuxtánucleares (foto 14) (Rodríguez, F. *et al*, 1994); mientras que con el anti-VPPA la positividad fue intensa en el citoplasma, de forma difusa, y muy intensa en cuerpos de inclusión yuxtánucleares (foto 15).

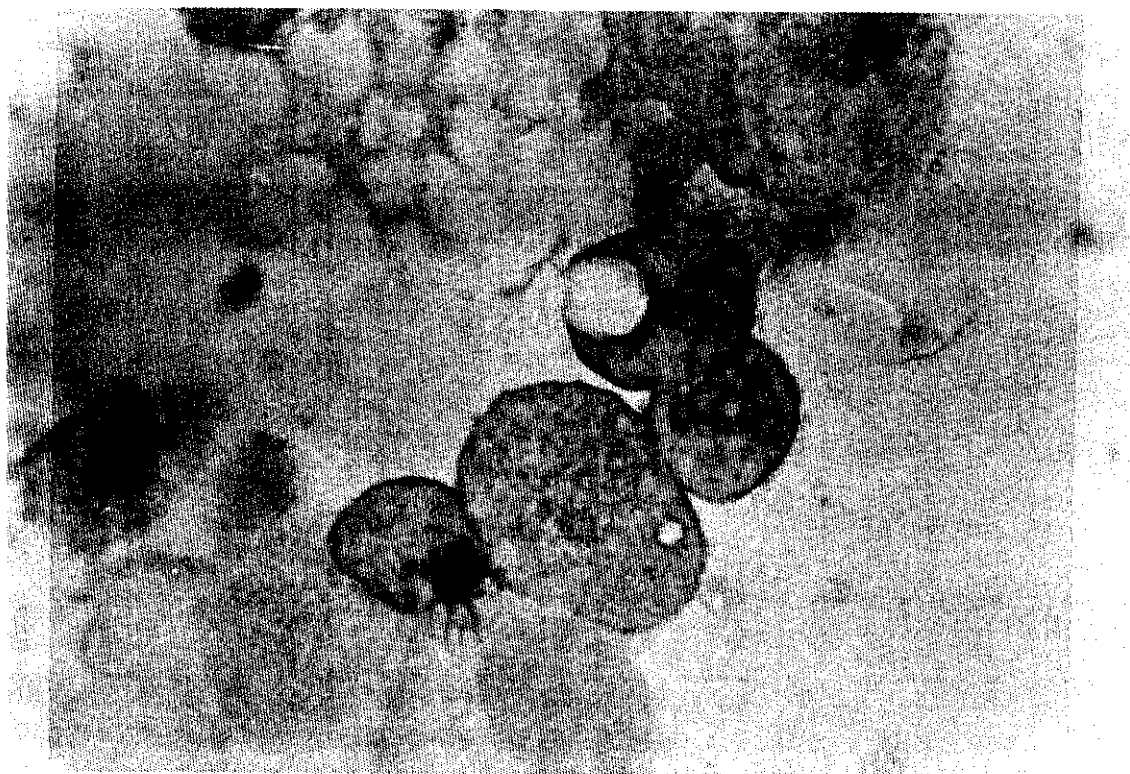


Foto 13.- Inmunotinción frente a la proteína p30. Células Vero infectadas con el VPPA. Extravidina-peroxidasa. 1000x.

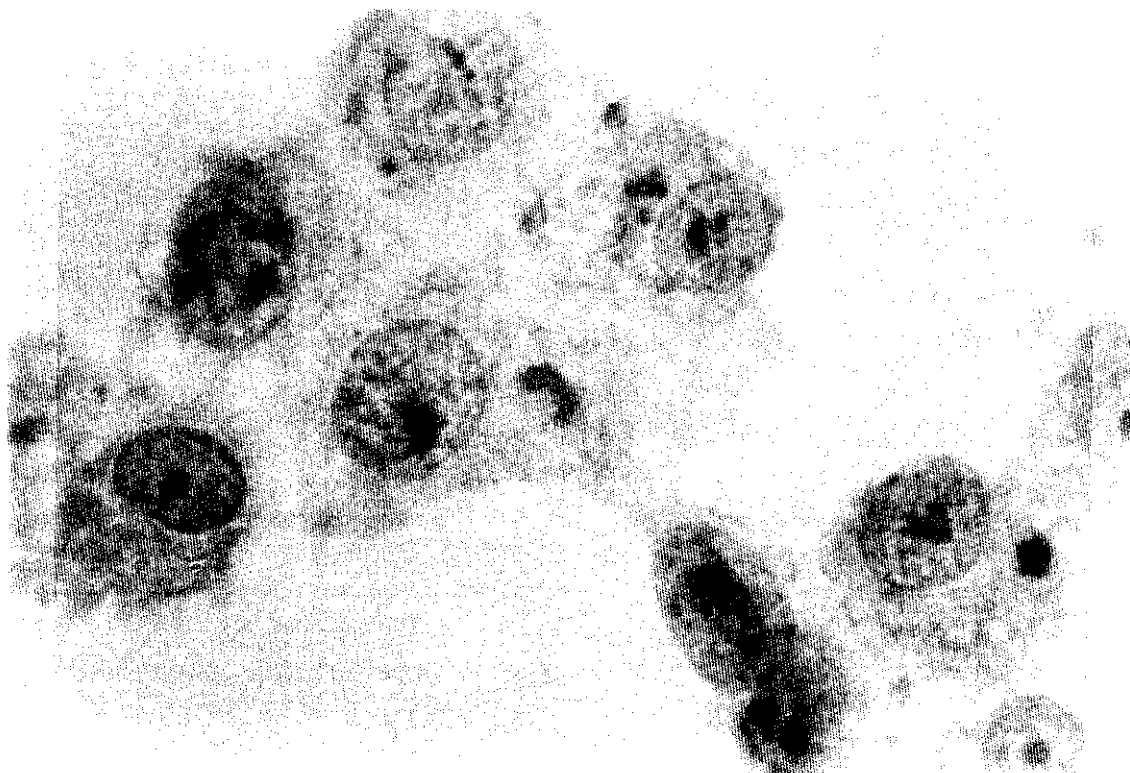


Foto 14.- Inmunotinción frente a la proteína p54. Células Vero infectadas con el VPPA. Extravidina-peroxidasa. 1000x.



Foto 15.- Inmunotinción frente al VPPA. Células Vero infectadas con el virus. Extravidina-peroxidasa. 1000x.

El estudio inmunohistoquímico de distribución del virus, realizado en los órganos del cerdo 6v se incluye en la misma tabla que los cerdos inmunosuprimidos e infectados con el aislado E70 virulento.

2.D.- Valores hematológicos.-

2.D.1.- Recuentos globales de leucocitos.-

En cerdos inmunocompetentes inoculados con el virus virulento, el recuento de glóbulos blancos presentó un moderado descenso inicial y posteriormente observamos una marcada leucocitosis en el día 7 (57.300 células/mm³)(fig. 19).

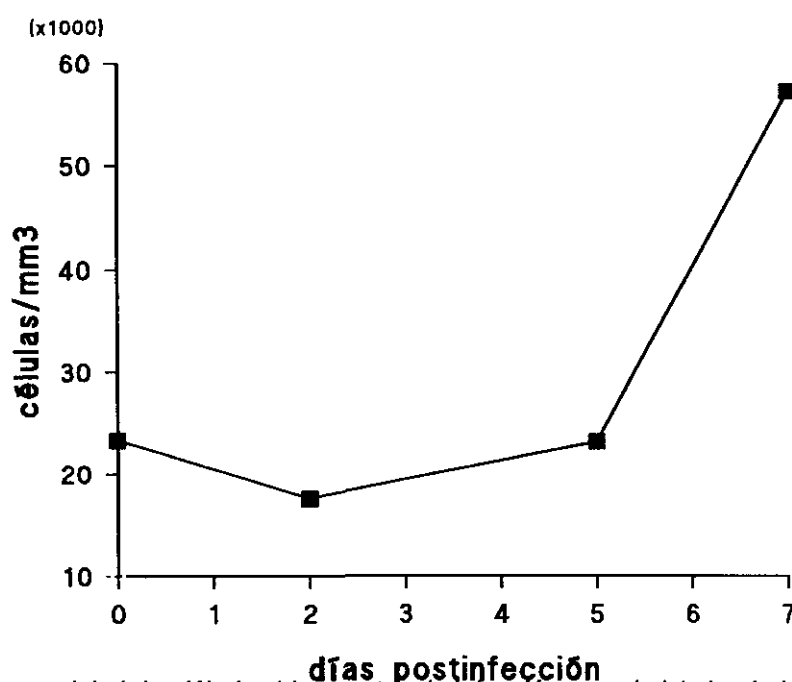


Fig. 19.- Recuento global de glóbulos blancos tras la infección con el aislado virulento E70 del VPPA.

Los valores se expresan como el número de células/mm³ de sangre.

2.D.2.- Recuentos diferenciales de leucocitos. Células inmaduras.

Durante la infección con el aislado virulento E70 observamos un ligero incremento

del porcentaje de linfocitos en el día 7 postinfección, con una moderada neutropenia y un notable incremento de los neutrófilos jóvenes.

Asimismo se observó un aumento de la proporción de monocitos durante el día 7 (de un 1,33% inicial a un 5,67%)(fig. 20).

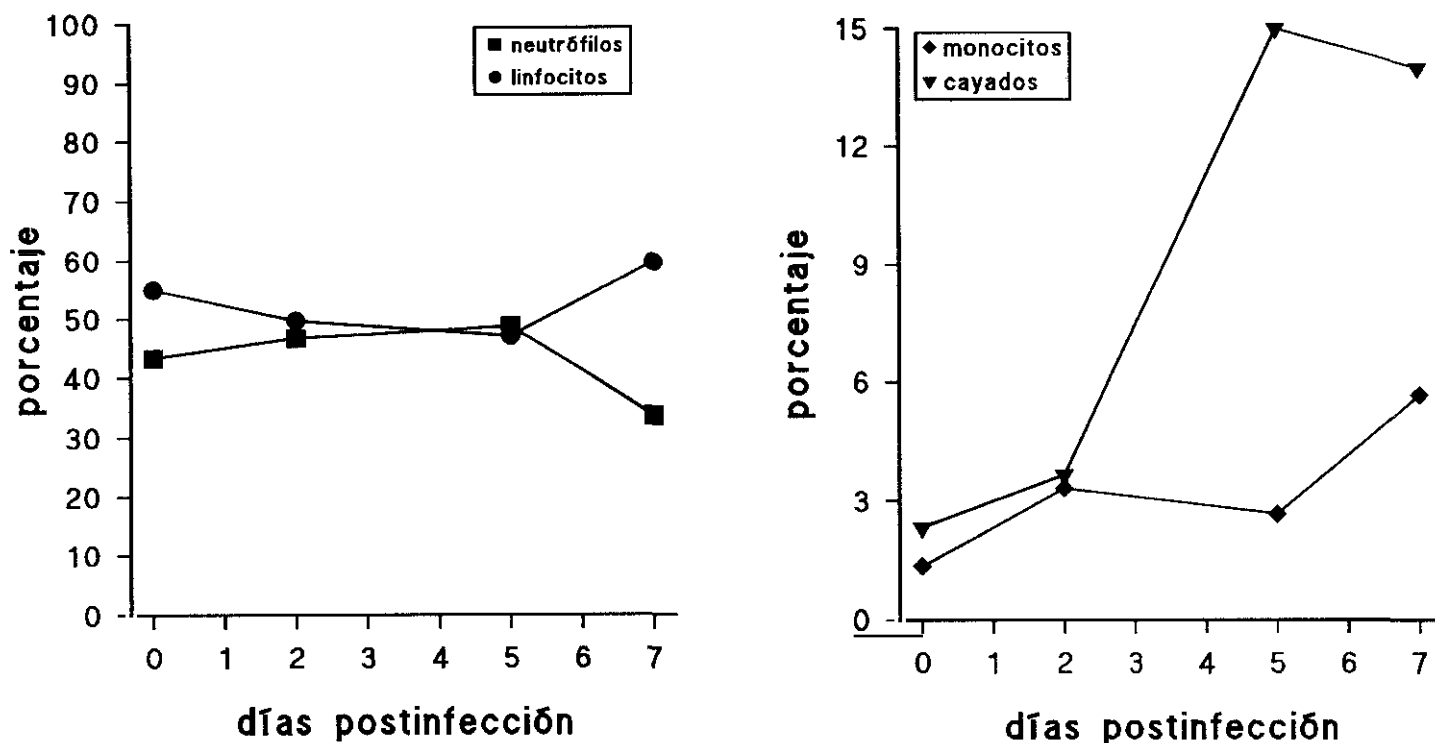


Fig. 20.- Recuentos diferenciales de glóbulos blancos en cerdos infectados con el aislado virulento E70.

2.E.- Poblaciones celulares de la respuesta inmune. Marcadores de activación.-

2.E.1.- Antígenos determinados en población de linfocitos.

2.E.1.2.- Expresión del antígeno CD8 en linfocitos de sangre periférica.-

El estudio de este antígeno en los cerdos infectados con el virus virulento se realizó con el anticuerpo monoclonal PT81B, que normalmente presenta mayores niveles de expresión en linfocitos que el antígeno determinado por el anticuerpo 76-2-11 (Saalmüller y Bryant., 1994).

La proporción de linfocitos CD8⁺ en los cerdos infectados con el aislado virulento se incrementó en un 35% respecto a la cifra basal en el día 7 postinfección.

El canal medio de fluorescencia de los linfocitos positivos se incrementó un 51% en el día 2, presentando un máximo en el día 7 (78,5% ↑) (fig. 21).

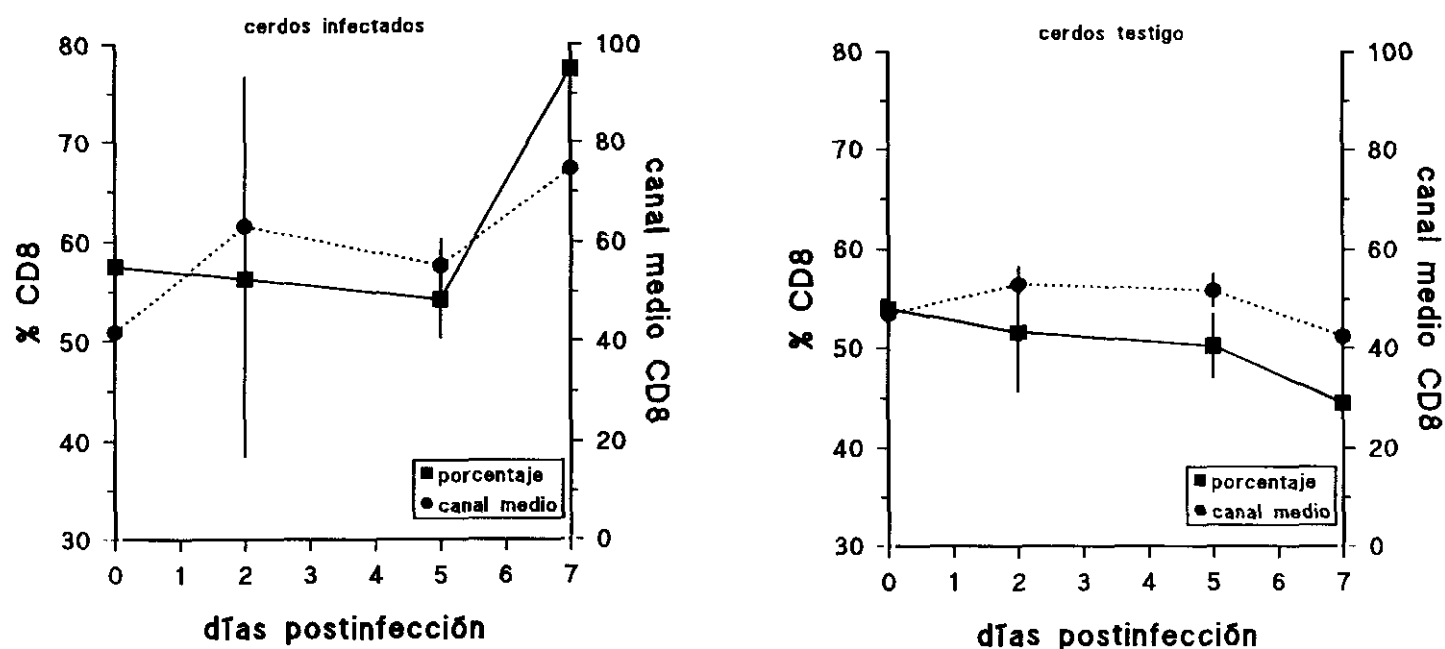


Fig. 21.- Proporción de células CD8⁺ y expresión media del antígeno en linfocitos de sangre periférica de cerdos infectados con el aislado E70 virulento.

2.E.1.2.- Expresión del antígeno CD4 en linfocitos de sangre periférica.

La proporción de células CD4⁺ en la población de linfocitos se incrementó de forma temprana, aunque moderadamente, en el día 2 postinfección. Sin embargo en el día 5 se presentó un aumento más llamativo (75% ↑) acompañado de un aumento de la fluorescencia media, porcentaje que disminuyó bruscamente dos días después (fig. 22).

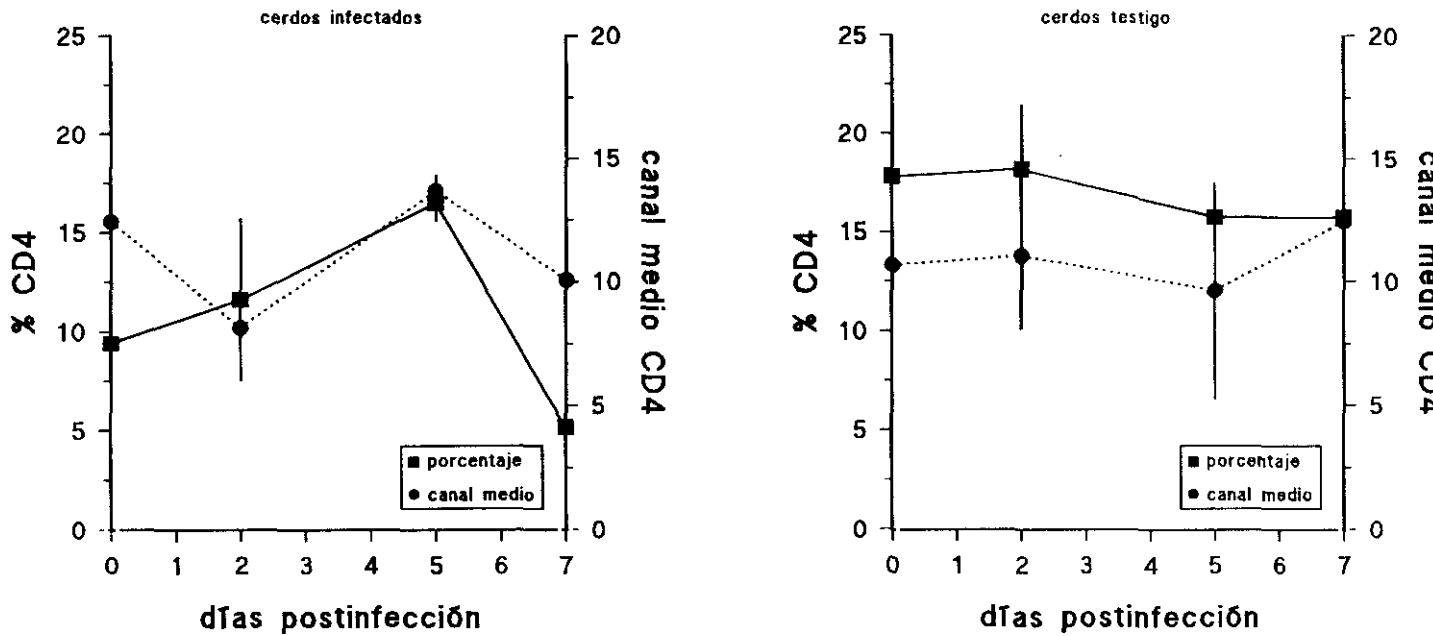


Fig. 22.- Variaciones en el porcentaje de células $CD4^+$ y fluorescencia media en linfocitos de sangre periférica a lo largo de la infección con el virus virulento E70.

2.E.1.3.- Células dobles positivas $CD4-CD8$ en sangre periférica.-

A lo largo del desarrollo experimental con el aislado E70 virulento el porcentaje de linfocitos dobles positivos $CD4^+-CD8^+$ se elevó en el día 5 (75% ↑), con la mínima proporción en el día 7 postinoculación (14,5% ↓) (fig. 23).

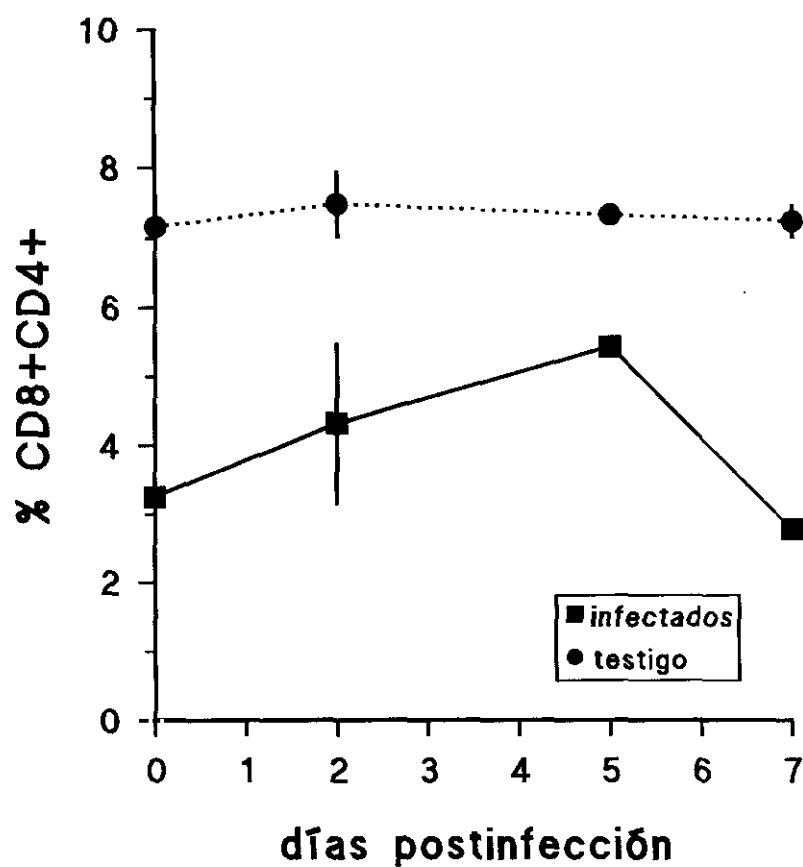


Fig. 23.- Variaciones en la proporción de linfocitos dobles positivos ($CD4^+$ - $CD8^+$) durante la infección con el aislado E70 virulento del VPPA.

2.E.1.4.- Expresión del receptor de IL-2 en linfocitos de sangre periférica.-

La fluorescencia media del receptor de IL-2 en linfocitos de sangre periférica disminuyó a lo largo de la semana de infección, con un mínimo en el día 5 y en el día 7 (67,35% ↓) (fig. 24).

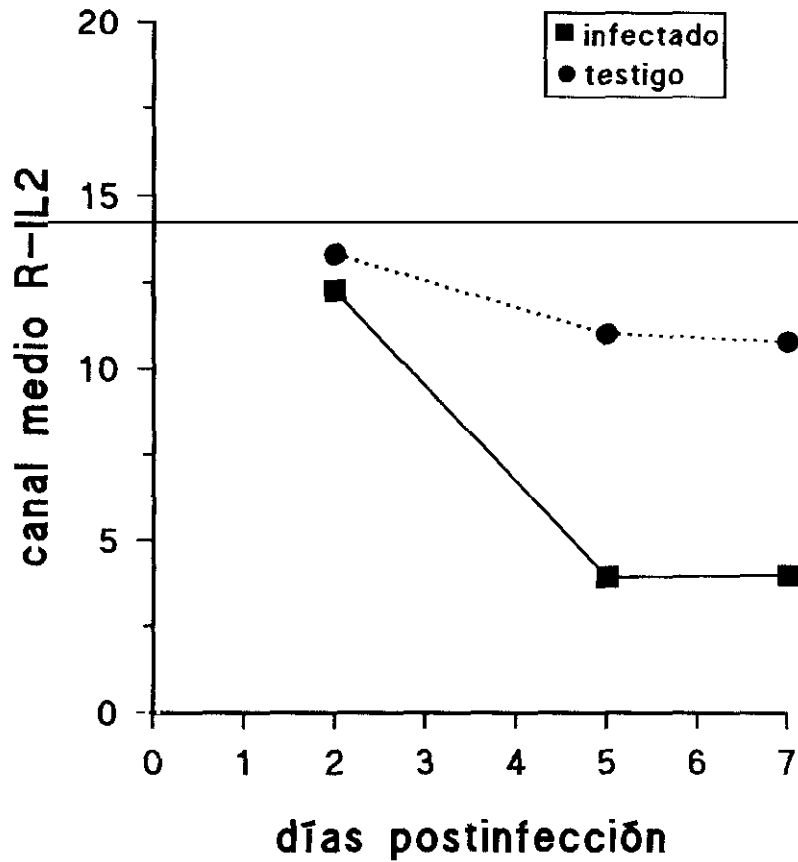


Fig. 24.- Expresión media del receptor de IL-2 en linfocitos de sangre periférica de cerdos infectados con el aislado virulento E70.

2.E.1.5.- Linfocitos B en sangre periférica.-

A lo largo de la infección desarrollada por el virus virulento hemos observado un máximo porcentaje de linfocitos B en el día 2 postinoculación (40% ↑ al valor inicial) y una representación mínima de esta población en el día 7 (40,5% ↓).

La fluorescencia media varió de forma paralela al porcentaje de células con una máxima expresión de IgM de membrana en el día 2 y un mínimo en el día 7 postinfección (fig. 25).

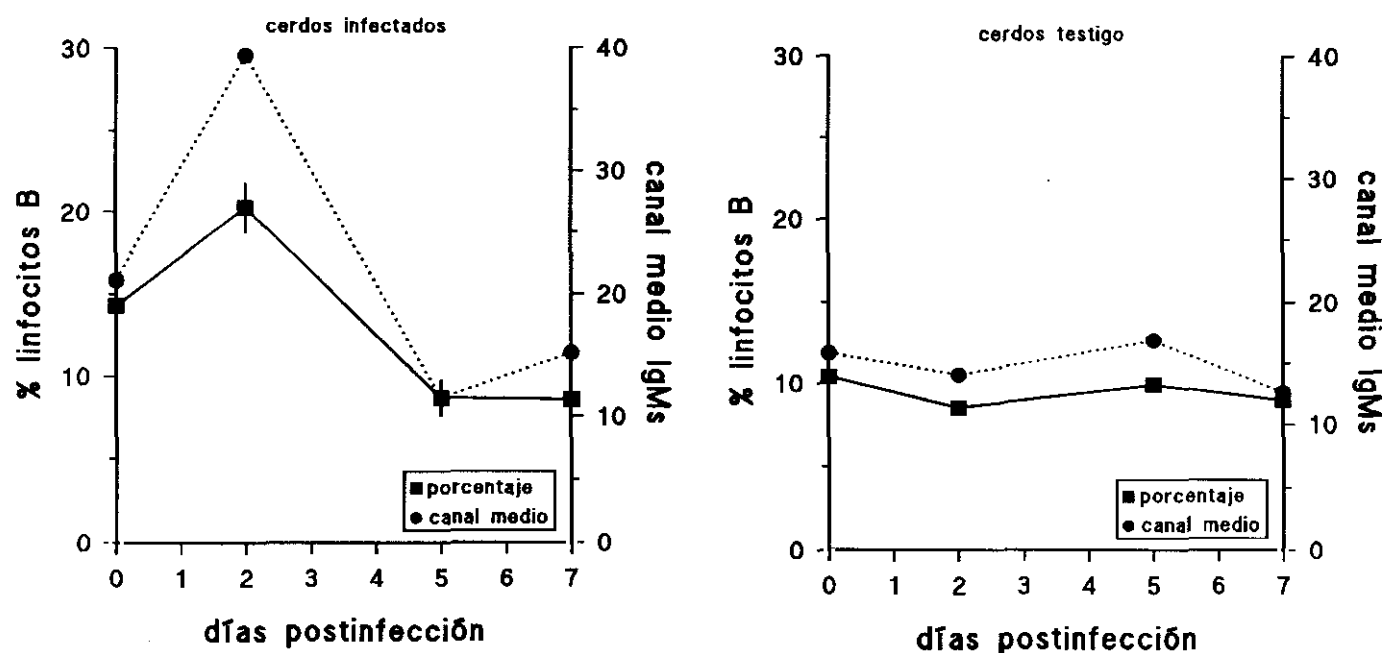


Fig. 25.- Variaciones en la proporción de células B y expresión media del antígeno IgM en linfocitos de sangre periférica durante la infección con el aislado virulento E70.

2.E.2.- Antígenos determinados en población de células mononucleares.-

2.E.2.1.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-I o SLA-I.-

Durante la infección experimental con el aislado virulento E70 la fluorescencia media presentada por las células mononucleares para el SLA-I fue máxima en el día dos postinoculación (20% ↑), con una mínima expresión en el día 7 (10% ↓) (fig. 26).

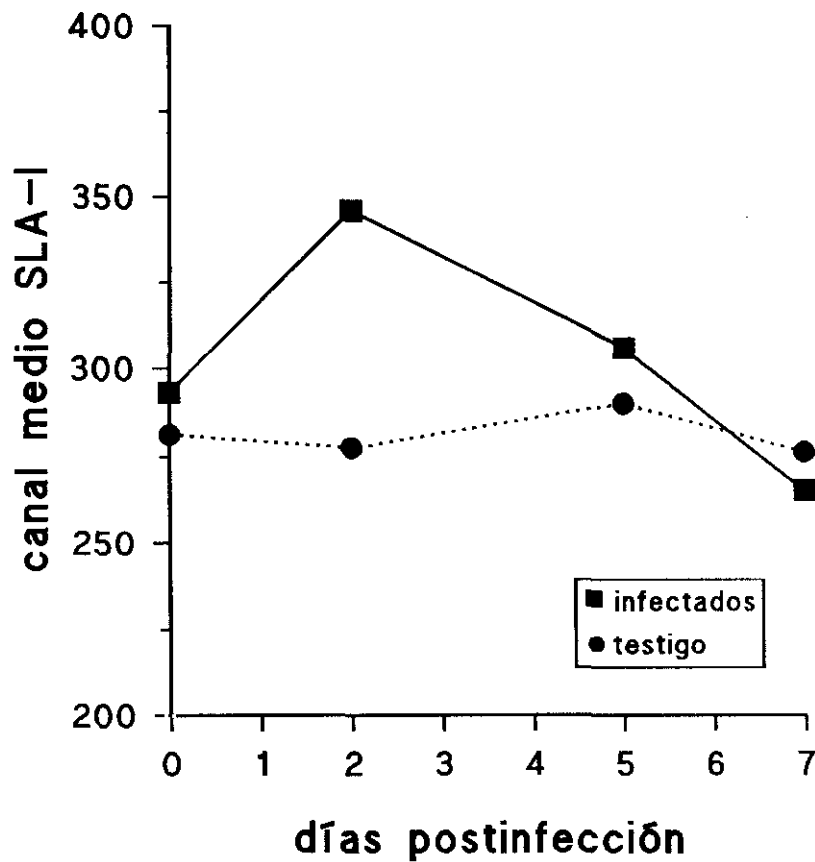


Fig. 26.- Expresión media del antígeno SLA-I en células mononucleares de sangre periférica de cerdos infectados con el aislado virulento E70.

2.E.2.2.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-II o SLA-II.-

Las células que expresaron la proteína SLA-DRw del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II presentaron un porcentaje mínimo (22% ↓) en el día 5 postinfección, con un máximo del 14% de aumento sobre los valores basales durante el día 7.

En forma similar, la fluorescencia media de las células positivas fue mínima en el día 5 con un máximo en el día 7 postinoculación (fig. 27).

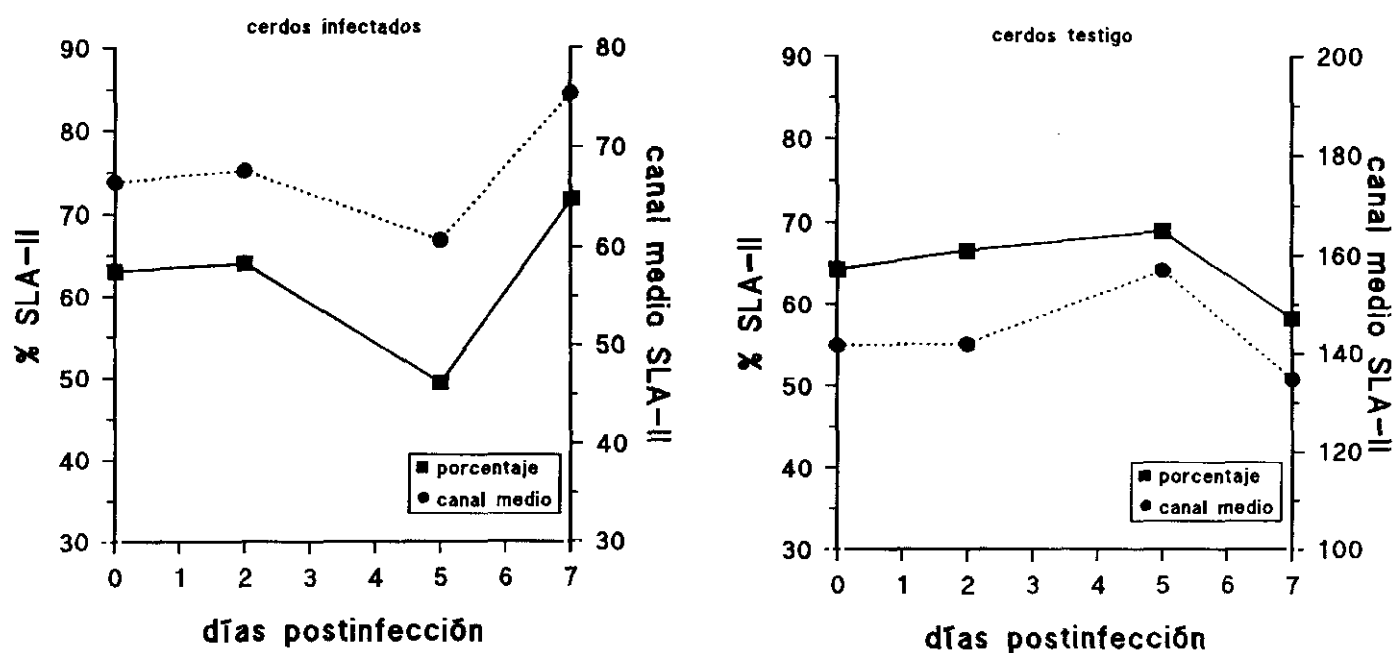


Fig. 27.- Porcentaje de células SLA-II⁺ y fluorescencia media del antígeno en células mononucleares de sangre periférica tras la infección con el virus virulento E70 de la PPA.

2.E.2.3.- Monocitos/macrófagos en sangre periférica.-

La proporción de monocitos en la población de células mononucleares de sangre periférica presentó un máximo temprano en el día 2 postinoculación (70% ↑ respecto al día cero). El día 7 la proporción de estas células llegó a disminuir hasta un 50% de las cifras basales (valor mínimo).

La fluorescencia media del antígeno reconocido por el anticuerpo 74-22-15 (SWC₃) tuvo un máximo de expresión en el día 2 que pasó a ser mínimo en el día 7 postinfección respecto al día 0 (fig. 28).

En resumen, de forma inicial se observó una estimulación sobre los monocitos/macrófagos similar a la observada para el virus atenuado. La diferencia está en una disminución brusca en la proporción y expresión antigénica media en los días de máxima viremia.

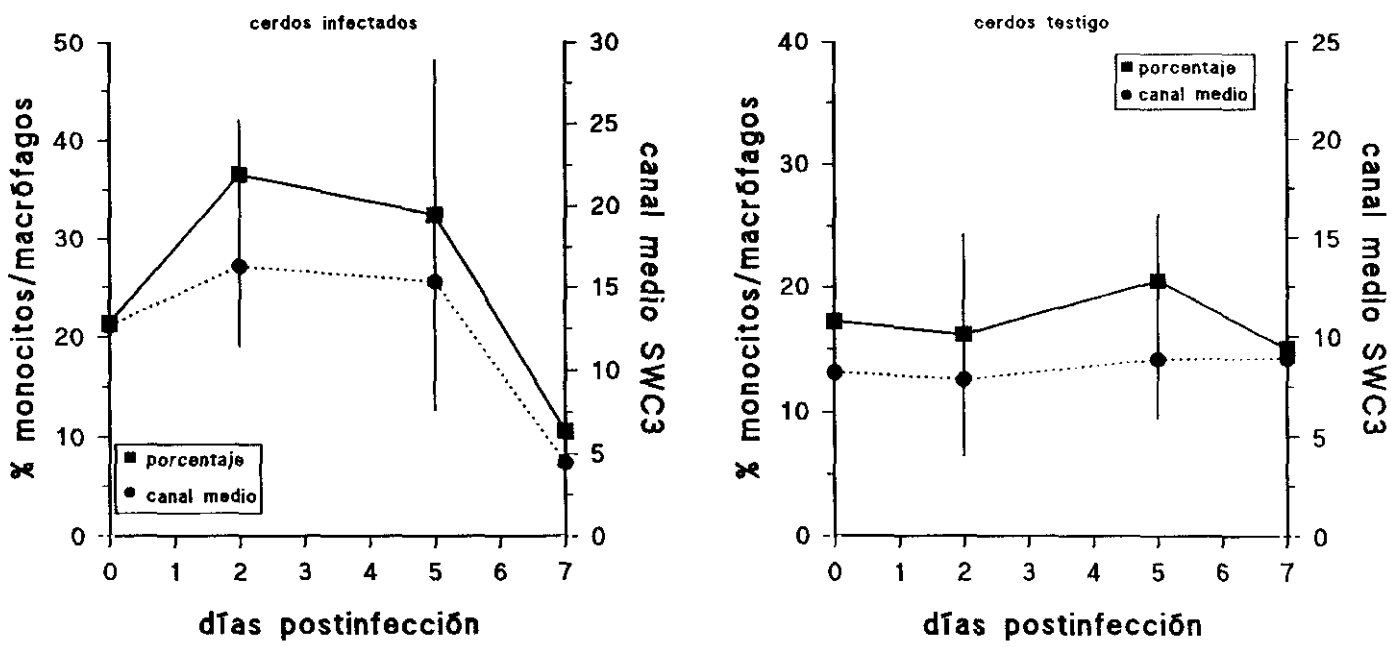


Fig. 28.- Proporción de células SWC₃⁺ y expresión antigénica media en células mononucleares de sangre periférica de cerdos infectados con el aislado virulento E70.

3.- EFECTO DE LA INMUNOSUPRESIÓN FARMACOLÓGICA EN LA INFECCIÓN POR EL VPPA.

Diversos modelos víricos experimentales presentaron importantes variaciones en la patogenia y en el desarrollo de la enfermedad tras realizar una inmunosupresión sobre el hospedador. Esta inmunosupresión puede llevarse a cabo por diferentes sistemas como a través de una inmunosupresión farmacológica (Altmann y Blyth, 1985; Bretscher y Havele, 1992; Bierer *et al*, 1993; Mustafa *et al*, 1993), una inmunosupresión mediante la utilización de anticuerpos específicos frente a un antígeno de la respuesta inmune (Cobbold *et al*, 1984; Waldman y Cobbold, 1993); a través de la creación de animales transgénicos o mediante la retirada específica de genes relevantes en respuesta inmune (knock-out) (Moskophidis *et al*, 1992). La mayor parte de estos modelos de inmunosupresión experimental han sido realizados en ratones de laboratorio.

Con el fin de estudiar el efecto de una alteración del sistema inmune en la patogenia de la peste porcina africana, utilizamos el inmunosupresor ciclosporina A durante la infección experimental con dos aislados de diferente virulencia. Las dificultades inherentes a un modelo experimental de infección vírica en cerdos se suman a las propias del desarrollo de un modelo de inmunomodulación en una especie poco caracterizada inmunológicamente.

La adición de ciclosporina A en un medio de cultivo de células infectadas con virus vaccinia (Clarissa y Keller, 1994) o virus Herpes Simplex (Valhne *et al*, 1992) produjo una inhibición dosis-dependiente de su capacidad replicativa. En el caso del virus de la PPA, la adición de CsA en el medio de cultivo a diferentes dosis no ocasionó ningún tipo de alteración en las propiedades replicativas del virus (fig. 29).

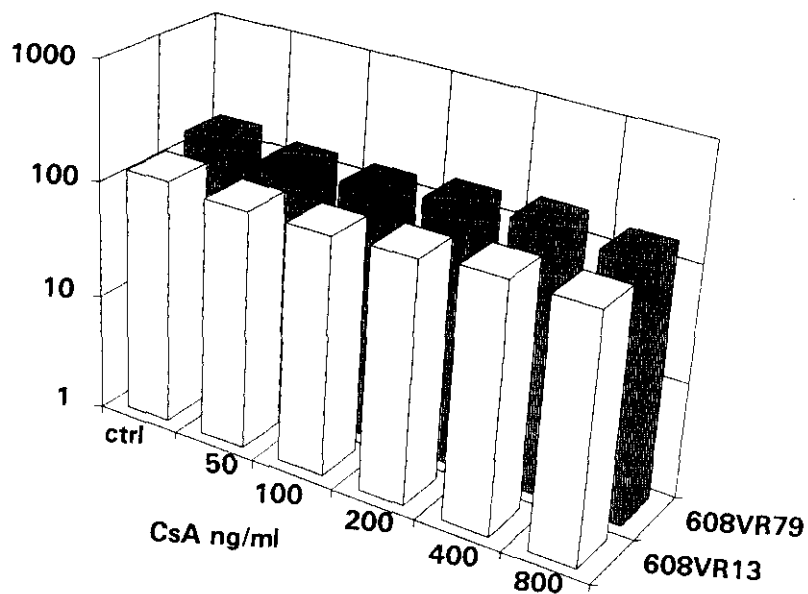


Fig. 29.- Formación de placas por diferentes aislados del VPPA en cultivos con CsA o sin ella. Las barras representan el valor del recuento de placas en cada pocillo.

3.A.- MODELO EXPERIMENTAL DEL VPPA ATENUADO E75CV₁-4 EN CERDOS INMUNOSUPRIMIDOS

3.A.a.- Curso de la infección. Formas clínicas. Temperatura.-

En este grupo once animales fueron inmunosuprimidos, siguiendo el protocolo explicado en Materiales y Métodos, siete de ellos desde el día previo a la infección experimental por vía oral con el aislado atenuado E75CV₁-4.

La sintomatología desarrollada por estos animales no fue cualitativamente diferente de la presentada en los animales inmunocompetentes, si bien en algunos animales las alteraciones de la coagulación se manifestaron de forma más intensa que lo observado en cerdos no inmunosuprimidos, (hemorragias postsangría, hematomas en zona de extracción...) (tabla 6).

Este grupo experimental presentó la misma frecuencia de cuadros agudos que los animales inmunocompetentes, pero la mortalidad de los cuadros subagudos fue superior. El aumento de la mortalidad pudo deberse en parte a la aparición de infecciones oportunistas en los animales, a pesar de la profilaxis antibiótica realizada.

Tabla 6.- Cuadro sintomático y desarrollo de la enfermedad.

Animal/inóculo	Sintomatología	Desarrollo
Cerdo 10/ 10^{5,6} DI₅₀	Eritema inguinal (días 12-19). Debilidad, disnea, inapetencia (días 18-19). Hipertermia (días 18-19).	PPA inaparente. Sacrificado día 19 pi.
Cerdo 11/ 10^{5,6} DI₅₀	Eritemas cutáneos (días 9-16). Inapetencia, adelgazamiento, debilidad, tremores (días 16-18). Hipertermia (días 7-11, días 14-21).	PPA tendente a crónica. Sacrificado día 21 pi.
Cerdo 12/ 10^{5,6} DI₅₀	Disnea, inapetencia, adelgazamiento, debilidad (días 6-14). Hematoma postsangría (día 12). Estertores traqueobronquiales, respiración abdominal, emaciación (día 14). Hipertermia (días 7-14).	PPA subaguda. Muerto día 15 pi.
Cerdo 13/ 10^{5,6} DI₅₀	Parada cardiorrespiratoria (día 2). Alteraciones respiratorias (días 5-9). Adelgazamiento, debilidad, eritemas en orejas y rabo, insuficiencia respiratoria (días 7-9). Hipertermia (días 5-7).	PPA aguda. Muerto día 9 pi.
Cerdo 14/ 10^{5,6} DI₅₀	Hipertermia ligera (día 9)	PPA inaparente. Sacrificado día 20 pi.
Cerdo 15/ 10^{5,6} DI₅₀	Apatía (día 5). Inapetencia, debilidad (días 13-17). Eritemas cutáneos en cuello y orejas (días 15-17). Alteraciones de la coagulación (día 16). Hipertermia (días 9-16).	PPA subaguda. Muerto día 17 pi.
Cerdo 16/ 10^{5,6} DI₅₀	Pérdida de apetito, debilidad (día 17). Hipertermia (días 5-10, días 14-17).	PPA subaguda. Muerto día 18 pi.

Cuatro cerdos más fueron inmunosuprimidos según el protocolo comentado en Materiales y Métodos después de haber alcanzado la máxima viremia (día 6 y 12 postinfección). Ninguno de ellos presentó una reagudización sintomatológica aparente, pero las cifras de viremia se mantuvieron altas en lugar de decaer por el aclaramiento del virus a partir de la segunda semana postinfección.

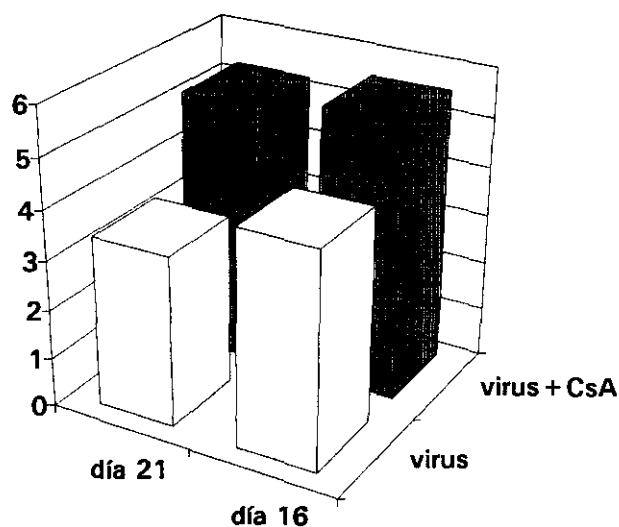


Fig. 30.- Viremias en fases finales del desarrollo experimental en cerdos inmunosuprimidos a diferentes fases postinfección.

Los períodos hipertérmicos desarrollados por los cerdos inmunosuprimidos fueron más frecuentes que en los cerdos inmunocompetentes, con incrementos significativos sobre la temperatura basal en los días 6 y 7 ($p < 0,05$), 9 y 11 ($p < 0,02$); y 14 y 15 ($p < 0,01$).

A partir del día 9 postinfección, las temperaturas medias presentadas en animales inmunosuprimidos fueron siempre mayores a las de los cerdos inmunocompetentes, siendo significativamente mayores en los días 14 ($p < 0,02$),

15 ($p < 0,05$) y muy cercano a una diferencia significativa en el día 16 ($p = 0,083$) (fig. 31).

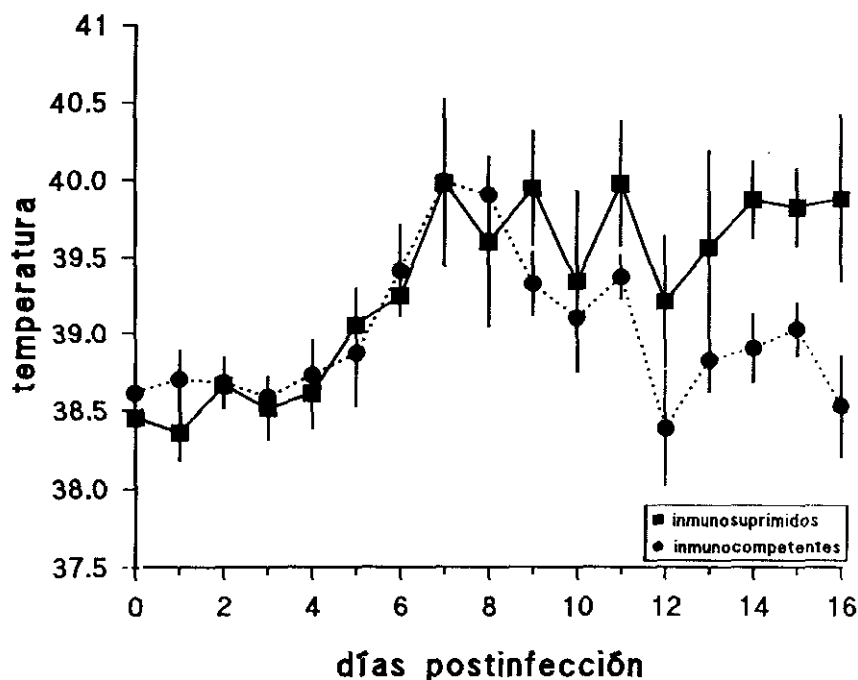


Fig. 31.- Evolución de la temperatura en cerdos inmunosuprimidos infectados con el aislado E75CV,-4. Comparación con la evolución de cerdos inmunocompetentes.

3.A.b.- Análisis de parámetros de infección.-

3.A.b.1.- Evolución del título de virus en sangre periférica.-

El virus se detectó en sangre periférica con cierta variabilidad, existiendo animales avirémicos durante la fase principal del experimento (cerdo 10), hasta animales con viremias elevadas desde los primeros días (cerdo 13).

Al igual que en el caso de los animales inmunocompetentes, las viremias más elevadas se correlacionaron con la aparición de una sintomatología más acentuada y fiebre. El proceso experimental indujo la muerte en cuatro de los siete animales, todos ellos con elevadas viremias.

Las viremias máximas variaron entre el día 7 y el día 16 postinoculación. El cerdo 10 presentó virus en sangre periférica en el día 19 postinoculación (tabla 7).

Los cerdos que empezaron a inmunosuprimirse en diferentes momentos durante la infección tendieron a presentar viremias más altas durante más tiempo que los cerdos inmunocompetentes.

Tabla 7.- Viremias desarrolladas en animales inmunosuprimidos e infectados con aislado atenuado.

(Los valores se expresan en logaritmos decimales de la dilución máxima de macerado de coágulo utilizada en la que se observa efecto citopático en el 50% de los pocillos)

	Día 2	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 14	Día 16
C 10	-	-	-	-	-	-	-
C 11	-	nd	3,19	5,19	5,02	4,19	nd
C 12	-	nd	4,19	6,35	6,19		
C 13	-	5,90	7,45				
C 14	-	-	1,90	1,90	1,90	1,90	-
C 15	-	-	-	-	4,69	5,19	7,35
C 16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

3.A.b.2.- Expresión de proteínas víricas en células de cerdos infectados.-

Al igual que en otros modelos experimentales, la proteína temprana p30 se detectó en la membrana de monocitos/granulocitos de sangre periférica durante los momentos de elevada viremia.

Los cerdos con viremias bajas (cerdos 11 y 14) o tardías (cerdo 10) presentaron una expresión difícilmente diferenciable del fondo, o bien posterior a

los días considerados. Así el cerdo 10 presentó una expresión de p30 del 23,93% en el día 19 postinoculación, coincidiendo con la aparición de virus en sangre.

Los cerdos con mayor sintomatología y desarrollo más letal de la enfermedad fueron los que presentaron mayor expresión de la proteína, tal y como ya observamos en el modelo E75CV₁-4 atenuado (tabla 8).

Tabla 8.- Porcentaje de expresión de p30 en células mononucleares 74-22-15 positivas.

	Día 0	Día 2	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 14	Día 16
C 10	3,83	3,47	1,92	1,85	1,22	4,08	nd	1,80
C 11	1,54	2,45	nd	0,67	2,62	nd	1,63	nd
C 12	nd	3,52	nd	1,63	11,45	21,56		
C 13	nd	1,87	14,40	14,44				
C 14	4,59	3,08	1,95	4,36	4,83	5,73	5,95	4,85
C 15	nd	2,60	4,21	2,43	2,73	6,27	11,13	8,26

3.A.c.- Anticuerpos durante la inmunosupresión. Efecto neutralizante.-

La producción de anticuerpos durante la infección en los cerdos inmunosuprimidos fue menor, en general, a la producción desarrollada por los inmunocompetentes, si bien la inmunosupresión no evitó la aparición en suero de anticuerpos específicos frente al virus (fig. 32).

La cinética de esta producción presentó, al igual que en los cerdos inmunocompetentes, un patrón ascendente hasta el momento de la determinación final en el día 16 postinoculación.

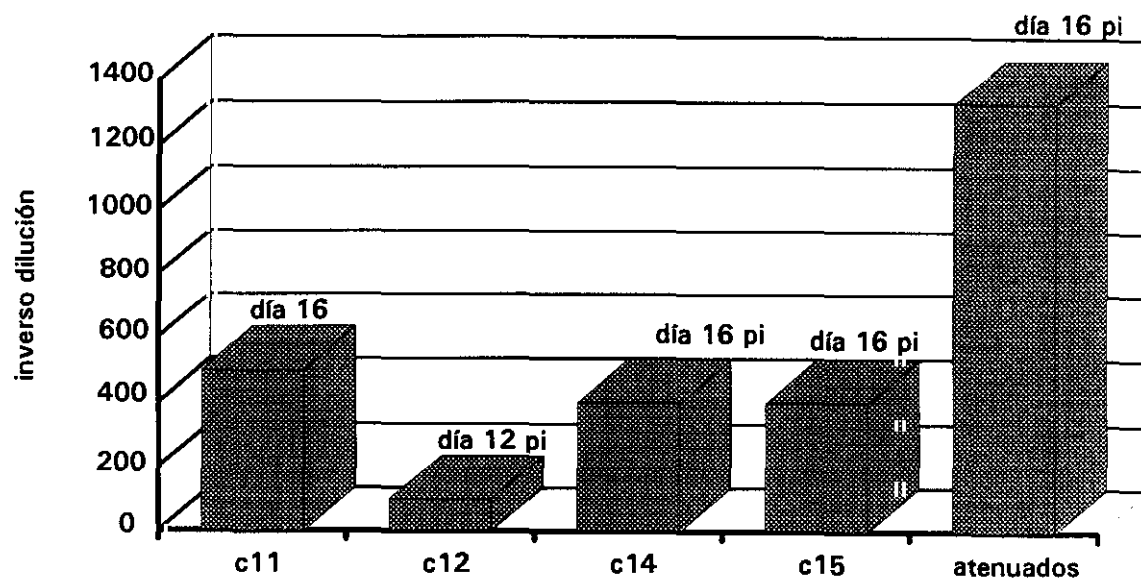


Fig. 32.- Título máximo de anticuerpos hasta los 16 días postinfección en cerdos inmunosuprimidos. Comparación con el título medio de cerdos inmunocompetentes. Las barras representan el recíproco de la mayor dilución de antisero que evidenció positividad.

Sin embargo, existieron diferencias en la capacidad neutralizante de los anticuerpos, de forma que los sueros de animales inmunosuprimidos presentaron una actividad neutralizante baja, a pesar de tener títulos de anticuerpos equivalentes a algunos sueros probados de los inmunocompetentes. La actividad neutralizante no llegó al 50% frente a algunos aislados víricos de bajo pase celular. En virus de alto pase no se obtuvo ninguna actividad neutralizante ni en animales inmunocompetentes ni en inmunosuprimidos (fig. 33).

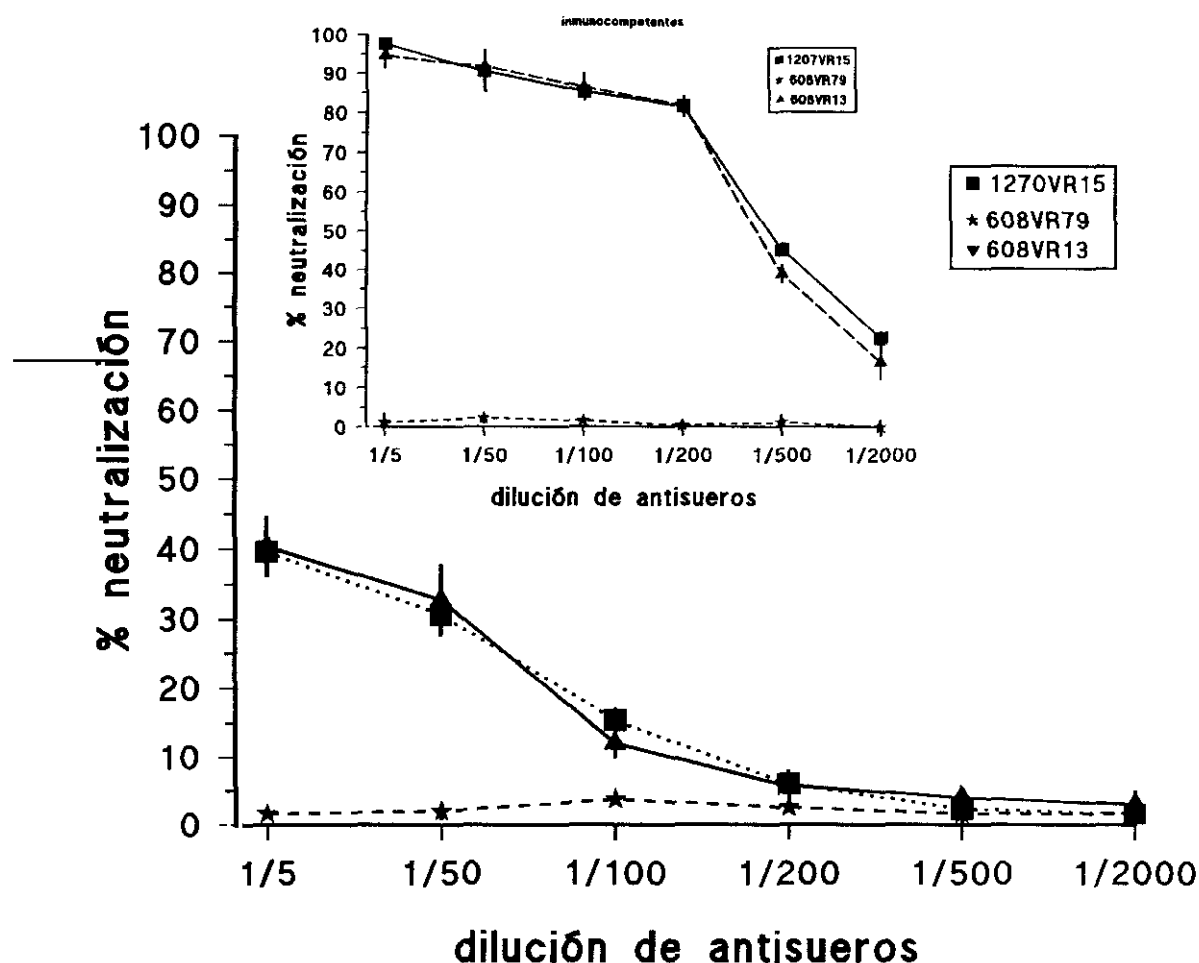


Fig. 33.- Ejemplo de cinética de neutralización en cerdos inmunosuprimidos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4. Comparación con la cinética en animales no inmunosuprimidos de título final de anticuerpos equivalente.

3.A.d.- Valores hematológicos.-

3.A.d.1.- Recuentos globales de leucocitos.-

Los valores obtenidos tras el recuento global de glóbulos blancos de los animales inmunosuprimidos en el día cero, fueron significativamente menores que

los valores iniciales de los animales inmunocompetentes ($p < 0,02$).

Apreciamos una disminución máxima del número total de leucocitos en el día 12 postinoculación (32,29%↓), que se recuperó para elevarse un 35,76% sobre el valor inicial en el día 16 (fig. 34).

Así pues observamos una moderada leucopenia transitoria en los días 5 y 12, y una tendencia a la leucocitosis en el día 16. Estos cambios en la cifra total de leucocitos de sangre periférica fueron similares a los que se encontraron en cerdos inmunocompetentes a lo largo de la infección, excepto por la leucopenia del día 12. Este día la diferencia entre los valores de ambos grupos de animales fue estadísticamente significativa ($p < 0,02$).

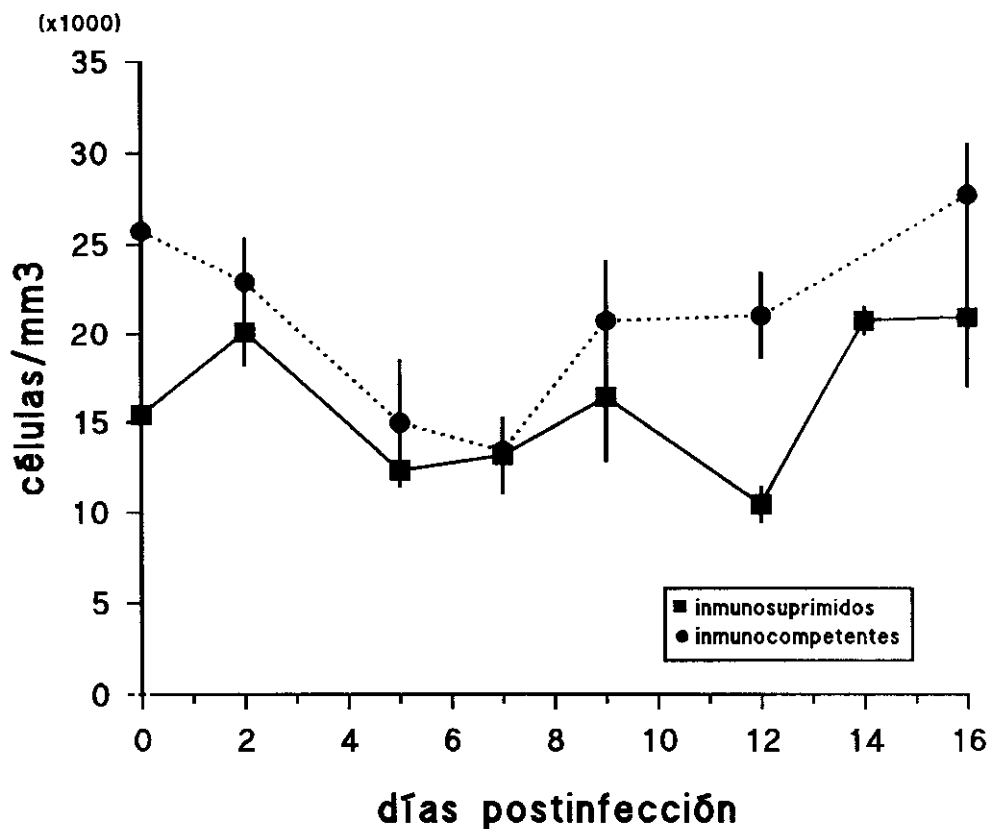


Fig. 34.- Recuento global de leucocitos en cerdos inmunosuprimidos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4. Comparación con esos mismos valores en animales infectados no inmunosuprimidos. Los valores se expresan como el número de células/mm³ de sangre.

3.A.d.2.- Recuentos diferenciales de leucocitos. Células inmaduras.-

En este grupo de animales observamos una diferencia inicial en la proporción de las diferentes poblaciones de leucocitos, respecto a los cerdos no inmunosuprimidos.

Los linfocitos presentaron un porcentaje máximo en el día 9 postinoculación, siendo en este momento superior en un 19,1% al valor inicial. No apareció la característica linfopenia del día 7 de los animales inmunocompetentes (en los cuales hubo una reducción del 32,93% respecto a valores basales). Tampoco pudimos observar la neutrofilia con formas juveniles presentada en ese día por los cerdos no inmunosuprimidos, sino que hubo una disminución de la proporción de neutrófilos en el día 9 y el máximo porcentaje de formas inmaduras fue observado en el día 16 postinoculación (11,7% de cayados) (fig. 35).

Es decir, la infección con el VPPA (aislado atenuado) supone la aparición de leucopenia y linfopenia con neutrofilia y formas inmaduras en sangre periférica. Sin embargo la infección en animales inmunosuprimidos modificó este patrón, apareciendo ligera linfocitosis y neutropenia.

Al igual que en el caso de los cerdos infectados con el modelo E75CV₁-4 no inmunosuprimidos, el porcentaje de monocitos osciló entre un 3 y un 6% durante los días del desarrollo experimental.

El cerdo número 13 fue el único animal inmunosuprimido que presentó un cuadro agudo tras la infección con el virus atenuado. Este cerdo manifestó en el día dos postinoculación unos valores hematológicos compatibles con un cuadro infeccioso previo con neutrofilia (72,67% de neutrófilos) y desviación a la izquierda (14% de cayados). Además fue el único cerdo inmunosuprimido en el que observamos una importante leucopenia en el día 5 postinfección, con valores similares de neutrófilos y linfocitos, que al igual que sucedió en animales inmunocompetentes se recuperó dos días después.

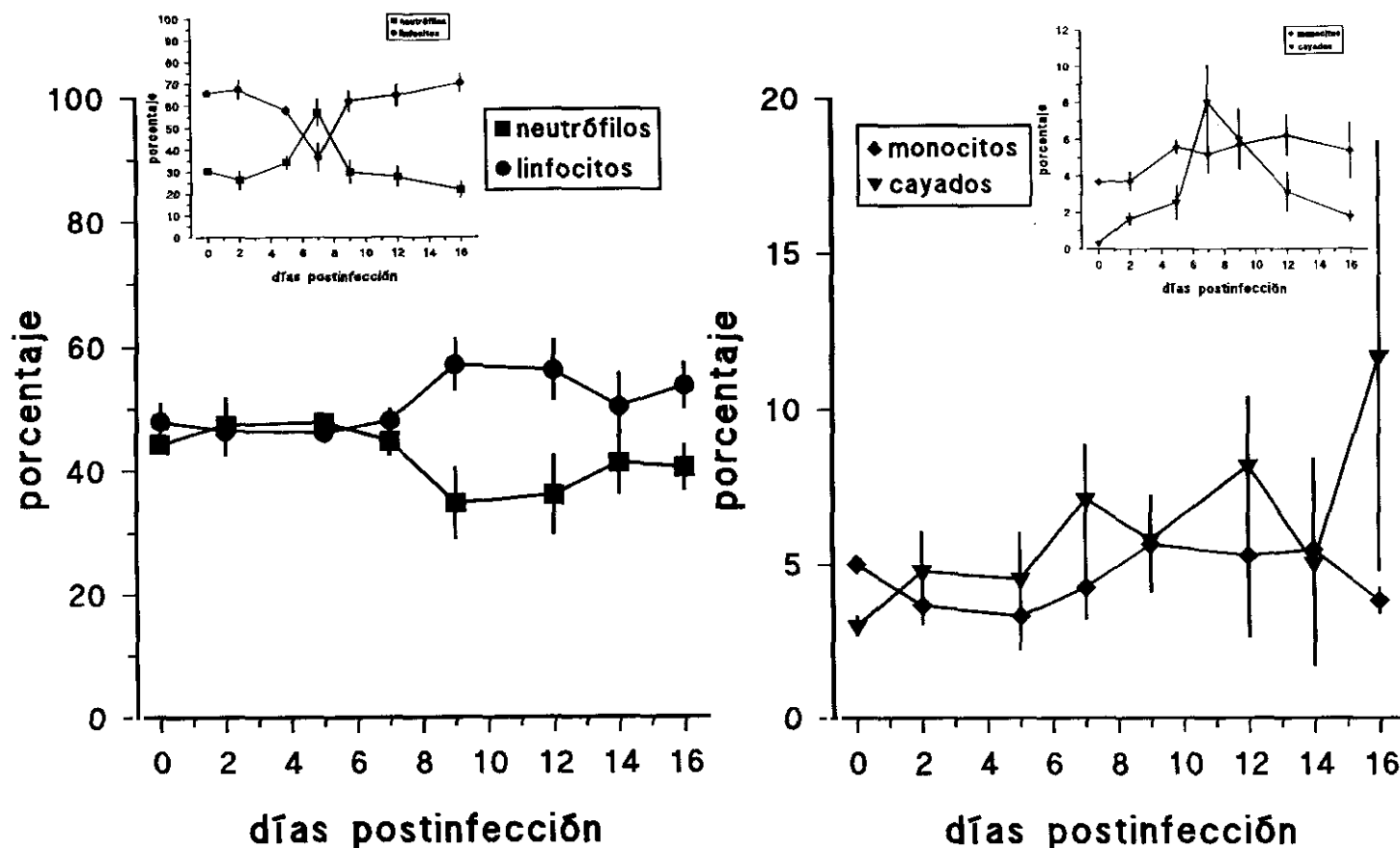


Fig. 35.- Recuentos diferenciales de leucocitos en cerdos inmunosuprimidos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4. Comparación con los valores obtenidos en cerdos inmunocompetentes.

3.A.e.- Poblaciones celulares de la respuesta inmune. Marcadores de activación.-

3.A.e.1.- Antígenos determinados en población de linfocitos.-

3.A.e.1.2.- Expresión de CD8 en linfocitos de sangre periférica.-

Al igual que lo observado en cerdos inmunocompetentes, la proporción máxima de linfocitos CD8⁺ se desarrolló entre los días 9-14 postinfección, con un

máximo en el día 12 (21,6% ↑). Previamente, en el día 2 postinfección cuando los animales llevaban tres días de tratamiento inmunosupresor, los porcentajes de linfocitos disminuyeron en un 19% respecto a los valores iniciales, alcanzando posteriormente proporciones de esta subpoblación similares a los cerdos inmunocompetentes en los días 9-12 postinoculación, no observándose diferencias significativas entre ambos grupos.

De forma paralela a las variaciones del porcentaje, la fluorescencia media de las células $CD8^+$ fue máxima en el día 12 (46,55% ↑), con elevadas expresiones en los días 5, 9 y 14. Esta sobreexpresión es anterior en este grupo de inmunosuprimidos, presentando una diferencia significativa con la fluorescencia media expresada en el día 5 en animales inmunocompetentes ($p < 0,01$) (fig. 36).

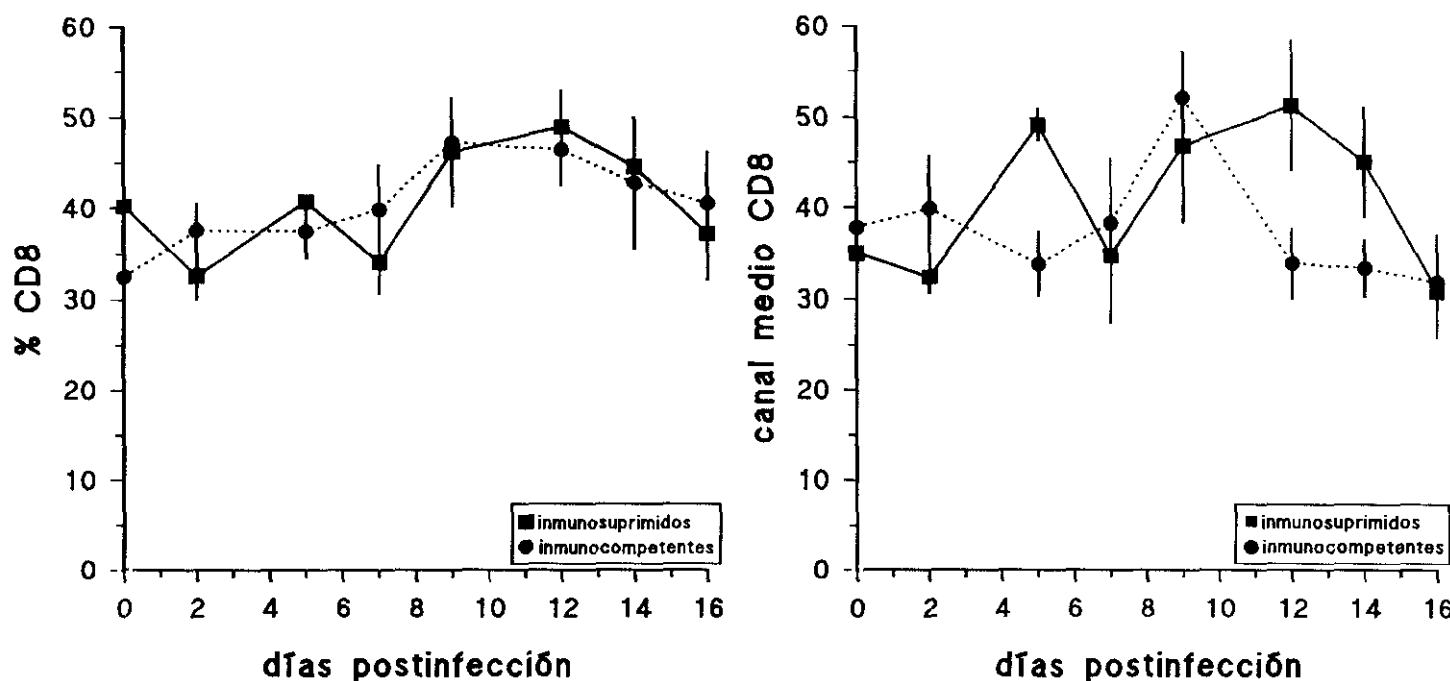


Fig. 36.- Variaciones en la proporción de células $CD8^+$ y expresión media del antígeno en linfocitos de sangre periférica de animales inmunosuprimidos infectados con el aislado atenuado E75CV,-4.

3.A.e.1.2.- Expresión del antígeno CD4 en linfocitos de sangre periférica.-

Las variaciones en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ en sangre de cerdos infectados con el aislado atenuado e inmunosuprimidos fueron similares a las desarrolladas en los animales inmunocompetentes, con la excepción de un descenso temprano en el día 2 (20,63% ↓), que también había sido observado en la proporción de linfocitos CD8⁺. El porcentaje de linfocitos CD4⁺ fue máximo en el día 12 postinfección (46% ↑). No hubo diferencias significativas con los porcentajes de linfocitos CD4⁺ de los cerdos inmunocompetentes.

La fluorescencia media de las células positivas fue máxima en el día 16 (80,43% ↑), momento en el que la diferencia con el valor inicial fue estadísticamente significativa ($p < 0,02$). Se observaron diferencias significativas con la fluorescencia media de los cerdos no inmunosuprimidos en el día 2 ($p < 0,05$) y en el día 16 ($p < 0,05$) (fig. 37).

De forma aislada un animal (número 13) presentó una proporción anormalmente alta de células CD4⁺, con valores superiores al 55% de células CD4⁺ en la población de linfocitos durante el día dos, y manteniéndose por encima del 40% en días subsiguientes. Esta sobreexpresión no apareció en la fluorescencia media de las células positivas. Este mismo animal había desarrollado una neutrofilia temprana, con intensa leucopenia transitoria en el día 5 postinfección. Además su expresión del antígeno SLA-I fue prácticamente nula, falleciendo en el día 9 del período experimental.

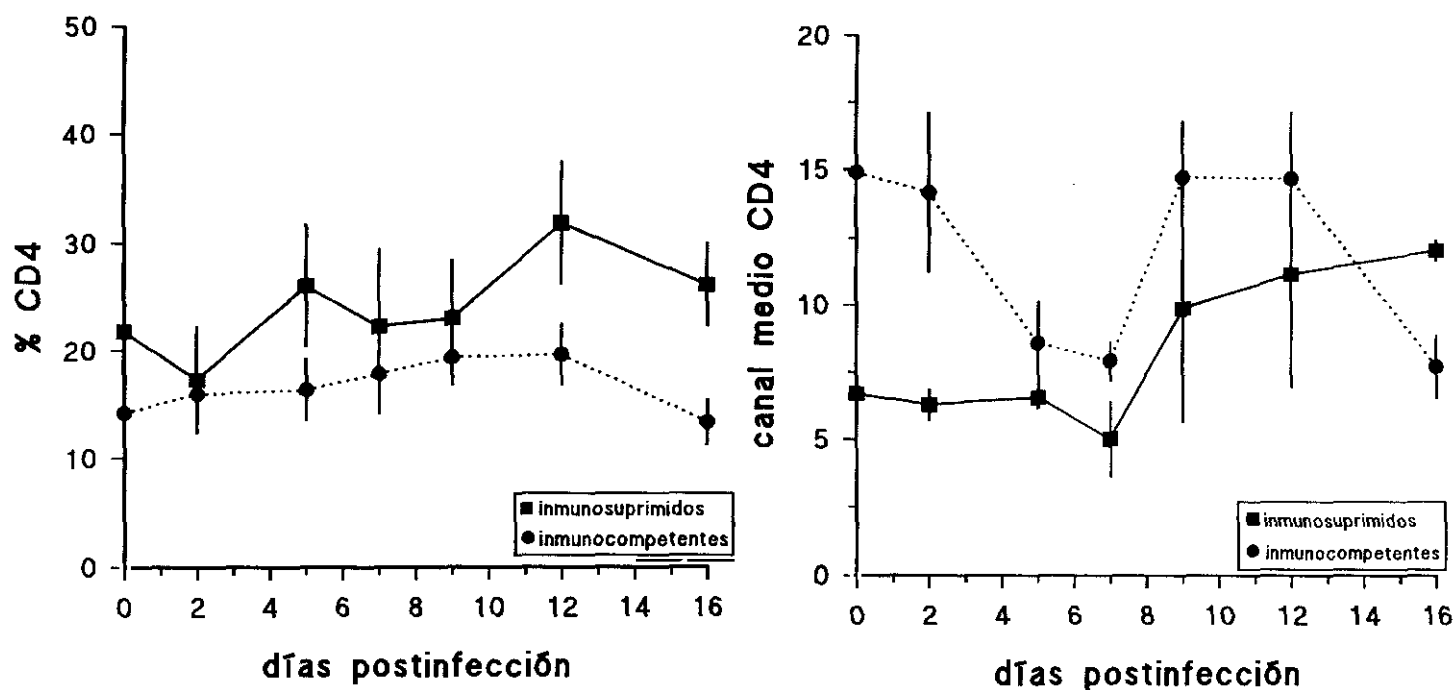


Fig. 37.- Porcentaje de células CD4⁺ y fluorescencia media del antígeno en linfocitos de sangre periférica de cerdos inmunosuprimidos infectados con el virus atenuado E75CV₁-4.

3.A.e.1.3.- Células dobles positivas CD4-CD8 en sangre periférica.-

La proporción de la población periférica de linfocitos dobles positivos CD4⁺CD8⁺ aumentó en el día 5 (50% ↑), para posteriormente disminuir hasta el día 16 postinfección (28,29% ↓). Así pues, los valores más bajos de esta subpoblación aparecieron durante el día 16 tanto en animales inmunocompetentes como en inmunosuprimidos, observándose una diferencia significativa entre ambos grupos en el día 5 postinfección ($p < 0,05$) (fig. 38).

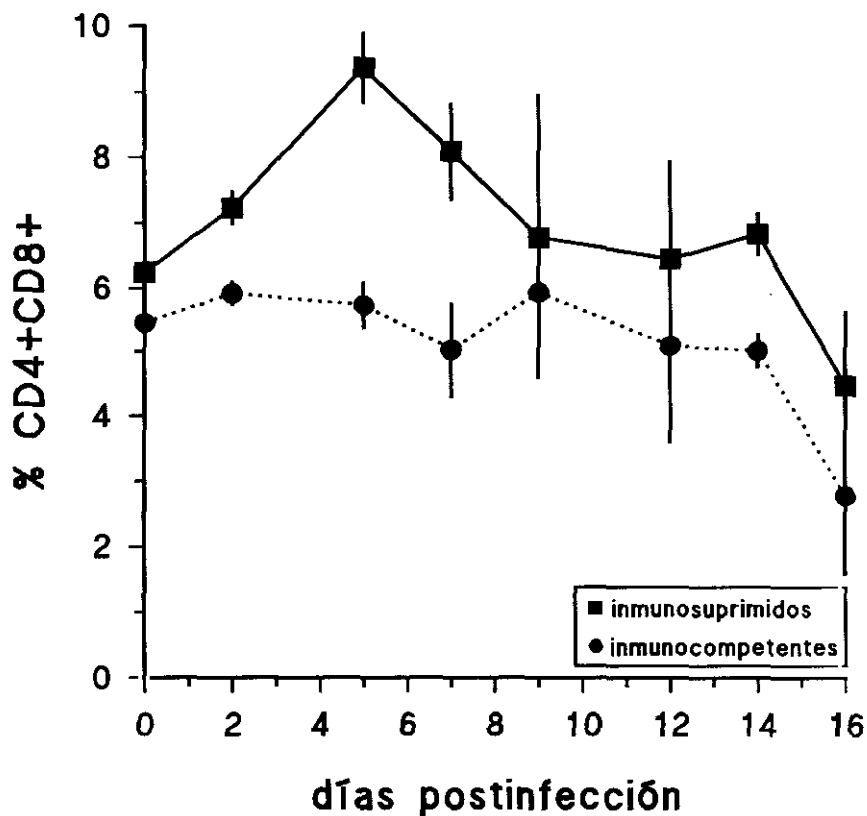


Fig. 38.- Variaciones en la proporción de linfocitos dobles positivos ($CD4^+-CD8^+$) en sangre periférica de cerdos inmunosuprimidos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4.

3.A.e.1.4.- Expresión del receptor de IL-2 en linfocitos de sangre periférica.-

La fluorescencia media de las células positivas para este marcador disminuyó con la inmunosupresión. Las diferencias con el grupo de inmunocompetentes fueron casi significativas ($p=0,08$) en el día cero y significativas en el día 2 postinfección ($p<0,05$). Sin embargo el descenso de la expresión del receptor de IL-2 a lo largo de la infección hizo que la fluorescencia media de animales inmunocompetentes se igualara con la de animales inmunosuprimidos desde el día 12 postinoculación, coincidiendo en ambos casos un mínimo en el día 14, que para este grupo fue un 75,9% menor al valor inicial ($p<0,005$) (fig. 39).

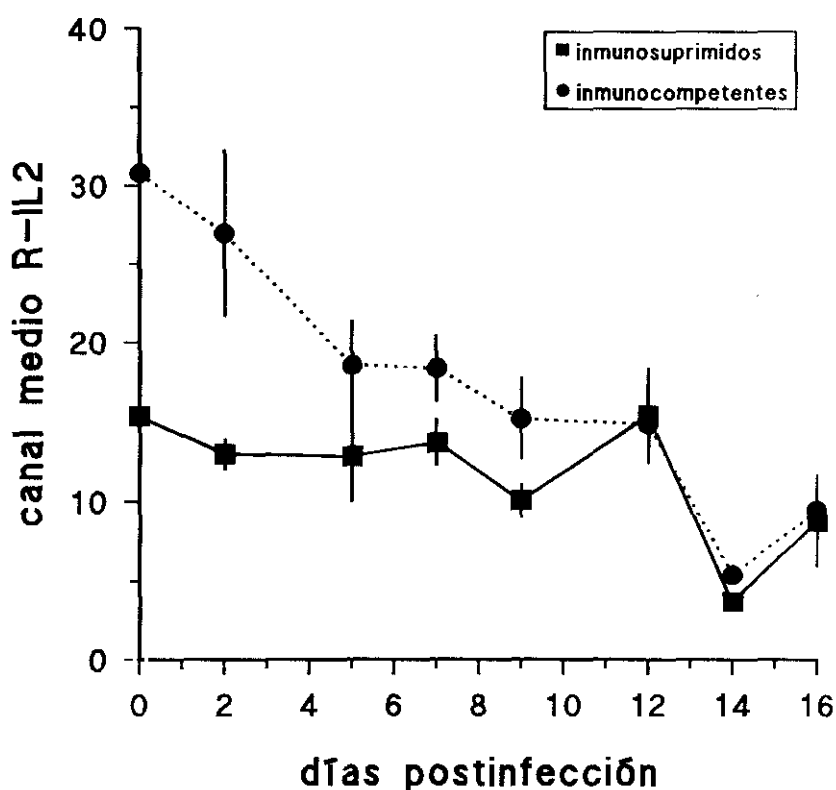


Fig. 39.- Fluorescencia media del antígeno CD25 (fracción α del receptor de IL-2) en linfocitos de cerdos inmunosuprimidos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4.

3.A.e.1.5.- Linfocitos B en sangre periférica.-

Al igual que observamos en los cerdos no inmunosuprimidos, los animales de este grupo experimental desarrollaron un incremento significativo de la proporción de linfocitos B ($p < 0,05$) en el día 7 postinfección (46,63% ↑), para disminuir también hacia el final de la segunda semana (29,35% ↓). Sin embargo, el aumento del día 7 si bien fue de menor nivel que el observado en los cerdos no inmunosuprimidos, se mantuvo algo más en el tiempo, hasta el día 12. En este momento apreciamos un máximo en la fluorescencia media de estas células y las diferencias con la expresión media de cerdos inmunocompetentes fueron significativas ($p < 0,02$).

La cantidad de antígeno IgM expresado en la membrana de los linfocitos B (canal medio de fluorescencia) fue máxima en el día 12 (50,67% ↑). El mínimo de fluorescencia media se presentó en el día 14 (48,85% ↓), permaneciendo también baja en el día 16 postinfección, comportamiento similar al de las células de los cerdos inmunocompetentes (fig. 40).

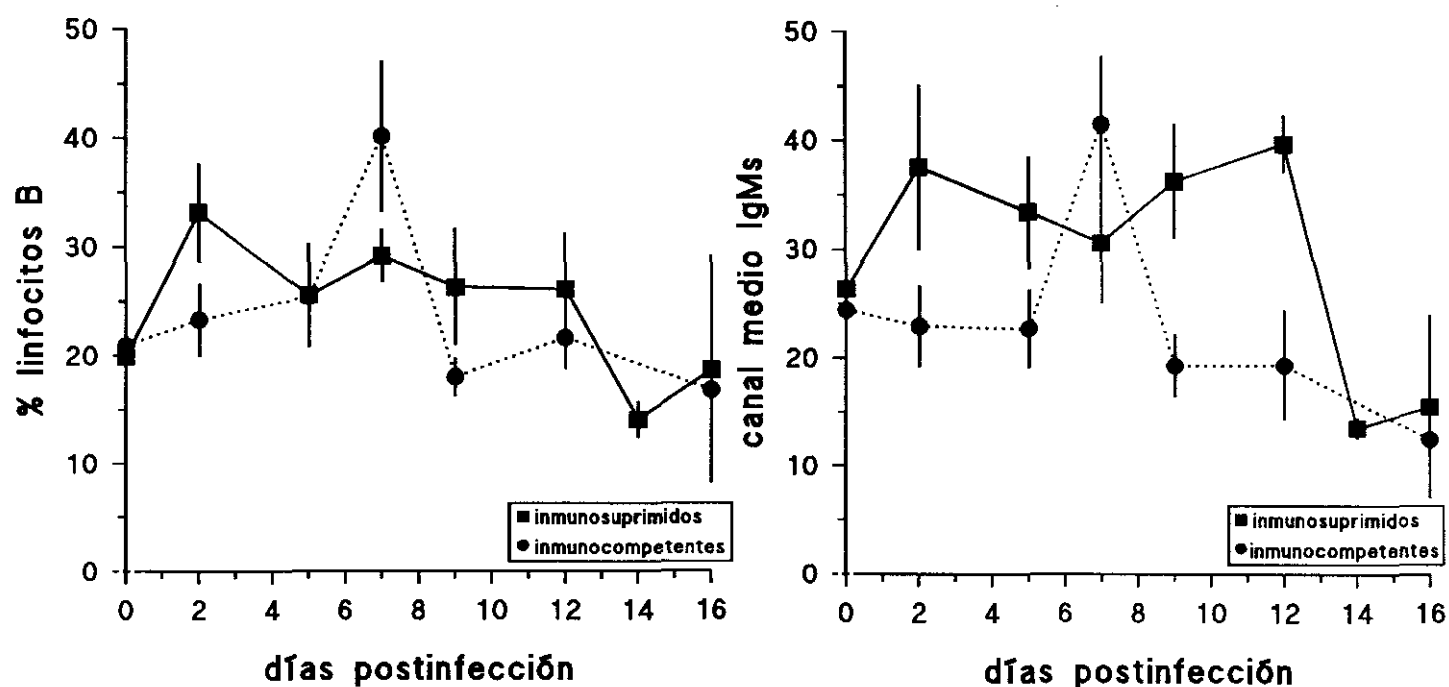


Fig. 40.- Variaciones en la proporción de células B y expresión media del antígeno IgM en linfocitos de sangre periférica de cerdos inmunosuprimidos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4.

3.A.e.2.- Antígenos determinados en población de células mononucleares.-

3.A.e.2.1.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-I o SLA-I.-

La expresión del antígeno mayor de histocompatibilidad clase I (SLA-I) resultó muy diferente a la observada en animales inmunocompetentes, sin encontrarse la elevación del día 7 postinfección, ni el descenso del día 16. En este

grupo de inmunosuprimidos se observó un mínimo en la fluorescencia media de las células mononucleares en el día 2 postinoculación (17% ↓). Tras ello la expresión aumentó hasta un máximo en el día 12 (23% ↑). Las variaciones observadas no fueron significativas en ningún momento, contrariamente a la observado en los cerdos no inmunosuprimidos, en los cuales se produjo un descenso significativo de la expresión en el día 16 (fig. 41).

A lo largo del experimento el animal número 13 presentó una expresión prácticamente nula del SLA-I, sin que aumentara en ninguno de los días en que se valoró este antígeno (fig. 42).

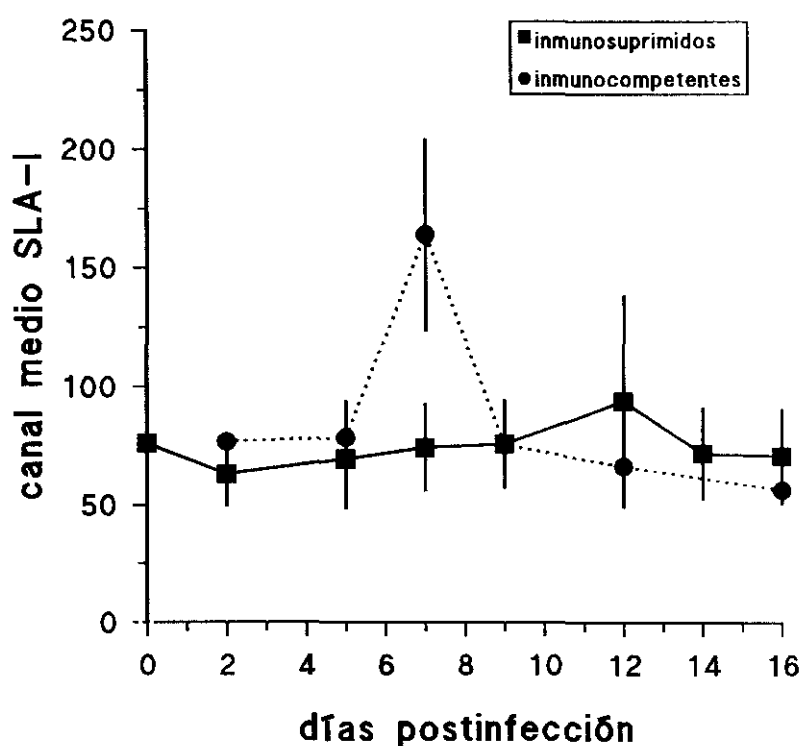


Fig. 41.- Fluorescencia media del SLA-I en células mononucleares de sangre periférica de animales inmunosuprimidos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4.

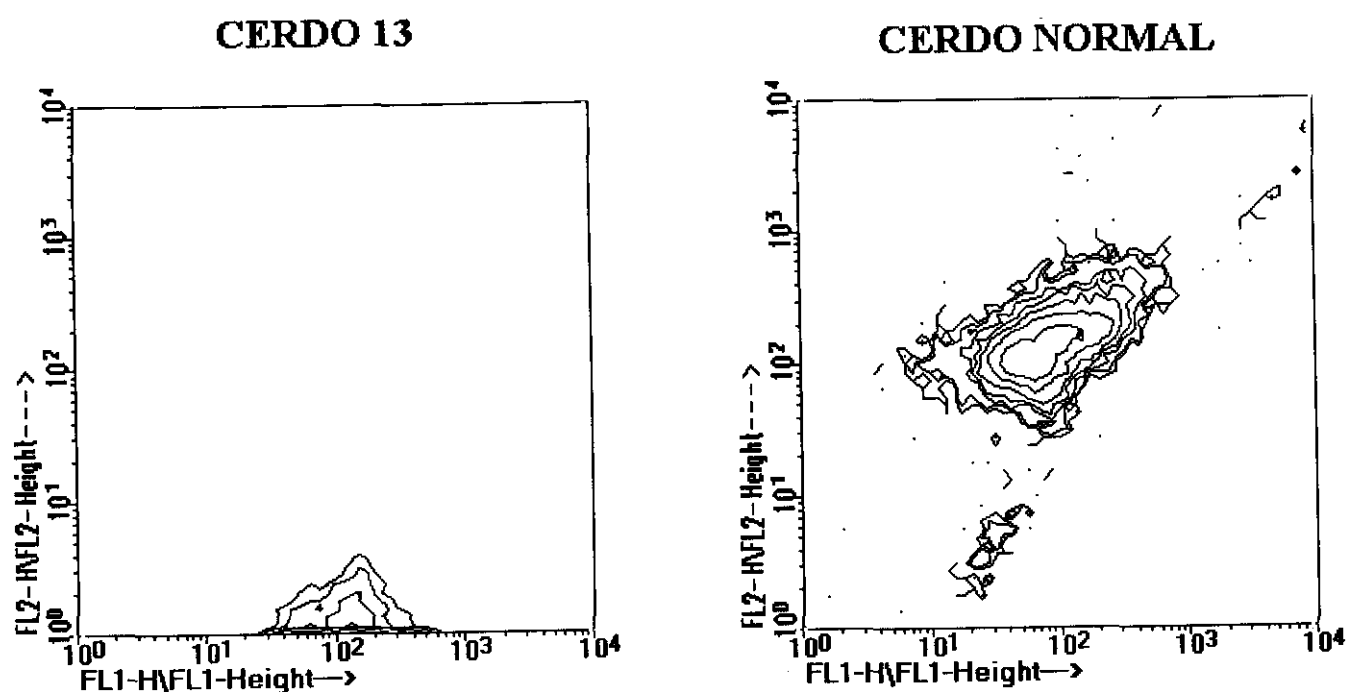


Fig. 42.- Representación bidimensional de la expresión de un antígeno panleucocitario (eje de las X) y del antígeno SLA-I (eje de las Y) del cerdo 13 y de un cerdo normal.

3.A.e.2.2.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-II o SLA-II.-

La proporción de células mononucleares SLA-II⁺ fue máxima en los animales inmunosuprimidos en el día 9 postinoculación, con un ligero aumento sobre los valores basales (3,07% ↑). Se observó un porcentaje mínimo de estas células en el día 16 (23% ↓).

La fluorescencia media de las células que expresaron este antígeno fue máxima durante el día 12 (19%↑), con una disminución significativa ($p < 0,01$) en el día 16 postinfección (36,86%↓) (fig. 43).

Es decir, durante la primera semana de infección experimental la expresión de SLA-II se mantuvo baja o a niveles basales y no se observó un aumento significativo en el día 7, a diferencia de lo observado en animales inmunocompetentes. Sin embargo ambos grupos presentaron una disminución significativa del SLA-II a partir de la tercera semana postinoculación.

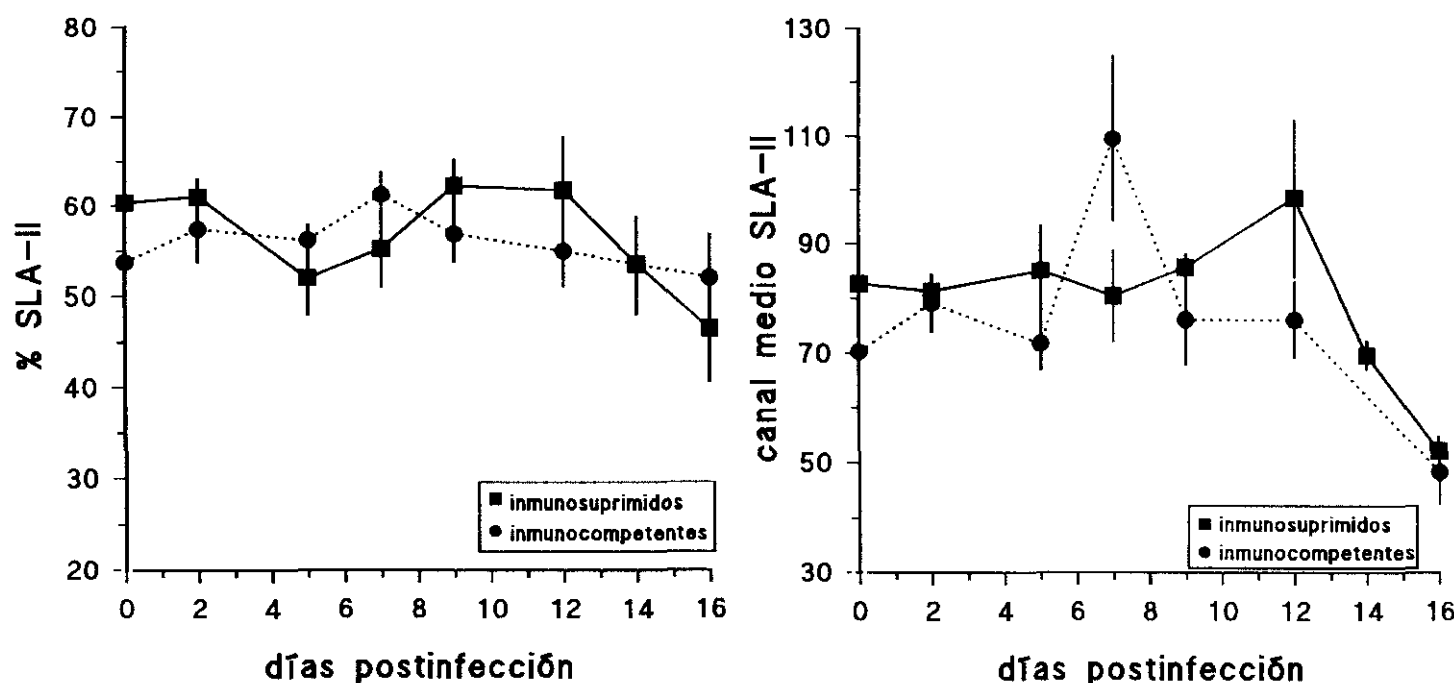


Fig. 43.- Variaciones en el porcentaje de células SLA-II⁺ y fluorescencia media del antígeno en células mononucleares de sangre periférica de cerdos inmunosuprimidos infectados con un aislado atenuado del VPPA.

3.A.e.2.3.- Monocitos/macrófagos en sangre periférica.-

La proporción en sangre periférica de células mononucleares SWC_3^+ aumentó significativamente ($p < 0,02$) en el día 2 postinfección (129,35% ↑) y se mantuvo significativamente elevada ($p < 0,05$) hasta el día 14, con un porcentaje máximo en el día 12 (191,9% ↑).

Esta elevación sostenida fue significativamente diferente ($p < 0,05$) en los días 2, 5 y 12 respecto a los animales no inmunosuprimidos y sólo coincidieron con valores elevados en el día 7.

La fluorescencia media de los monocitos SWC_3^+ fue máxima en el día 12 (28,37%↑), con una expresión mínima en el día 16 (20,21% ↓) y fue significativamente menor ($p < 0,05$) que la expresión media de las células de cerdos inmunocompetentes en el día 7 postinoculación (fig. 44).

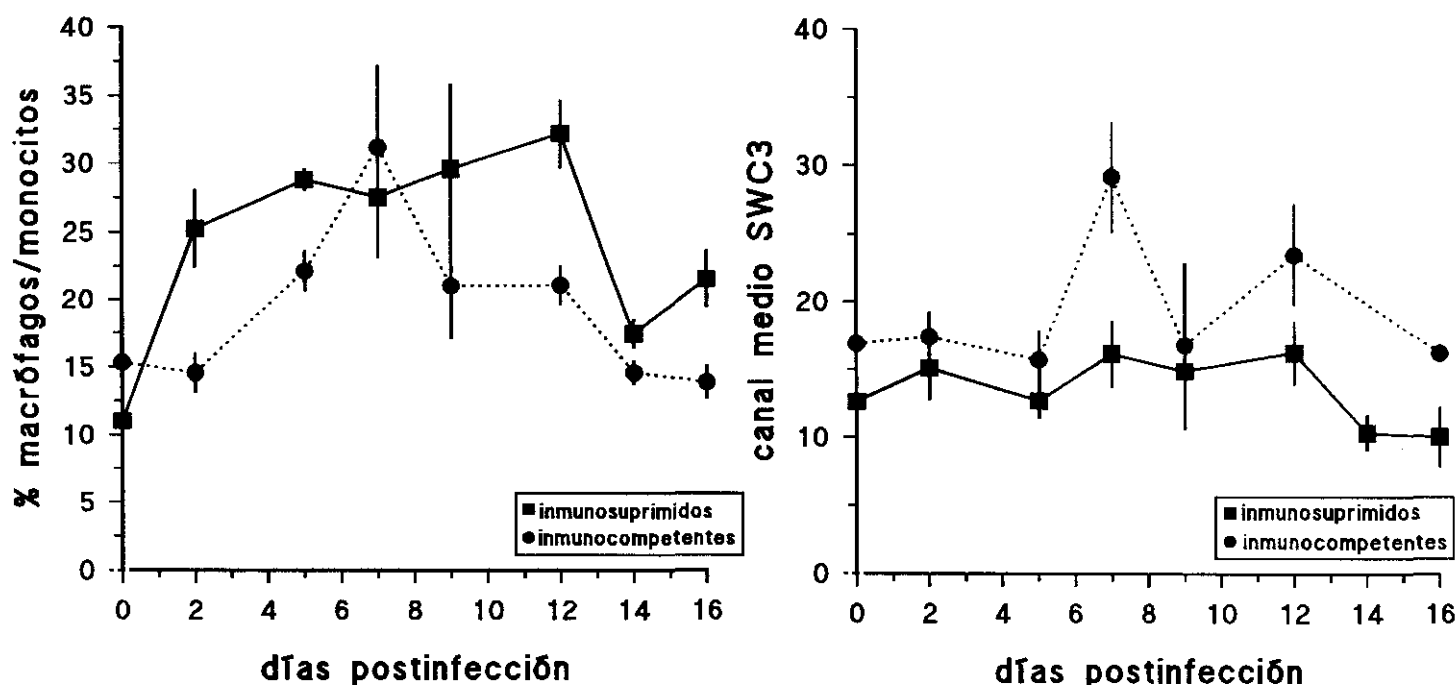


Fig. 44.- Porcentaje de células SWC_3^+ (monocitos/macrófagos) y fluorescencia media del antígeno en células mononucleares de sangre periférica de cerdos inmunosuprimidos infectados con el aislado E75CV₁-4.

3.B.- MODELO EXPERIMENTAL DEL VPPA VIRULENTO E70.-**3.B.a.- Curso de la infección. Formas clínicas. Temperatura.-**

La evolución clínica de los animales encuadrados en este grupo experimental no fue muy diferente de la presentada en los animales inmunocompetentes. Los síntomas principales de la enfermedad fueron las alteraciones de la coagulación, eritemas cutáneos con posterior evolución a necrosis, y hemorragias profusas tras las punciones experimentales. Los síntomas generales fueron muy manifiestos con debilidad, apatía y anorexia como antecedentes del desarrollo fatal de este proceso agudo (tabla 9).

Tabla 9.- Cuadro sintomático y curso de la enfermedad.

Animal/ inóculo	Sintomatología	Desarrollo
Cerdo 1v	Diarrea (Día 3), anorexia, eritema punta de orejas y rabo, sangre no coagula (días 5), necrosis punta de orejas y rabo y púrpura hemorrágica en pecho y abdomen, postración (día 6). Hipertermia (días 2-6).	PPA aguda. Muerto día 7 pi.
Cerdo 2v	Eritema extremo de orejas y rabo, anorexia , púrpura hemorrágica en tórax ventral (día 6-7). Hipertermia (días 2-7)	PPA aguda. Muerto día 7 pi.
Cerdo 3v	Eritema en punta de las orejas, anorexia (días 6-8). Hipertermia (días 2-7)	PPA aguda. Muerto día 8 pi.
Cerdo 4v	Anorexia (días 7-8), problemas de coagulación (día 8). Hipertermia (días 4-7).	PPA aguda. Muerto día 8pi.
Cerdo 5v	Anorexia (días 7-8), problemas de coagulación (días 7-8). Hipertermia (días 4-7).	PPA aguda. Muerto día 8 pi.

La temperatura media de los animales presentó un incremento significativo ($p < 0,02$) desde el día 4 al día 7 postinoculación con respecto a las basales. Las temperaturas máximas fueron mayores en los animales inmunocompetentes que en este grupo (fig. 45).

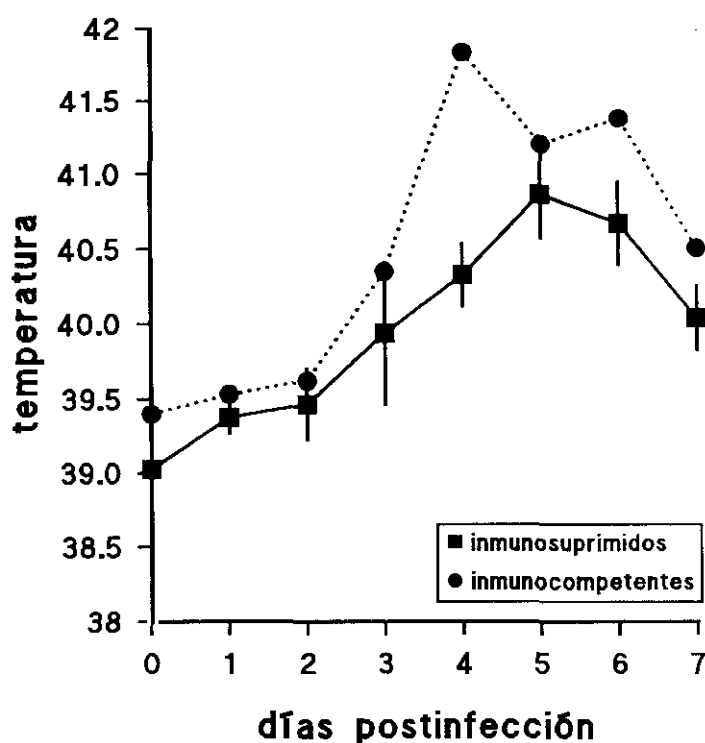


Fig. 45.- Temperatura media desarrollada por cerdos inmunosuprimidos infectados con el virus virulento E70. Comparación con los valores de cerdos infectados no inmunosuprimidos.

3.B.b.- Análisis de parámetros de infección.-

3.B.b.1.- Evolución del título de virus en sangre periférica.-

Fue posible detectar la presencia de virus en sangre periférica desde el día 2 postinfección en uno de los animales, aunque en el resto solamente se detectó viremia a partir del día 5 postinoculación (tabla 10).

Tabla 10.- Título de virus en sangre periférica.

	Día 2	Día 5	Día 7
Cerdo 1v	-	5,92	
Cerdo 2v	-	5,19	4,69
Cerdo 3v	2,9	nd	5,92

3.B.b.2.- Expresión de proteínas víricas en células de cerdos infectados.-

Una expresión manifiesta de la proteína temprana p30 no pudo detectarse hasta el día 5 postinfección, momento en el cual todos los animales probados presentaron un máximo de expresión de esta proteína en células 74-22-15 positivas. Al igual que en todos los casos anteriores, la máxima expresión de proteína p30 coincidió con la máxima viremia (tabla 11).

Tabla 11.- Porcentaje de expresión de p30 en células mononucleares 74-22-15 positivas.-

	Día 0	Día 2	Día 5	Día 7
Cerdo 1v	3,56	6,90	16,84	
Cerdo 2v	nd	3,42	13,65	6,75
Cerdo 3v	4,18	2,00	8,52	6,78

3.B.b.3.- Distribución del virus en órganos de cerdos infectados.-

Como ya hemos explicado en el apartado 2.B.3, tras probar varios anticuerpos en los tejidos de animales infectados, seleccionamos el anticuerpo policlonal anti-VPPA para realizar los estudios de inmunohistoquímica por la clara positividad demostrada en las reacciones de inmunocitoquímica.

De los tejidos probados la mayor positividad apareció en tonsilas, en las cuales pudimos observar células positivas tanto en las zonas interfoliculares como en el epitelio de las criptas y en células subepiteliales (foto 16).

En los ganglios linfáticos la mayor cantidad de células positivas se observó en los senos linfáticos internos y algo menor en los senos subcapsulares. También presentaron positividad ocasional las células foliculares dendríticas, elementos de morfología estrellada del centro de folículos linfoides. Un número escaso de células endoteliales así como de células de las trabéculas conjuntivas fueron también positivas (foto 17).

Las células más frecuentemente infectadas en los pulmones fueron macrófagos de las paredes alveolares y luces capilares, y en menor proporción macrófagos descamados en la luz alveolar. En ocasiones aparecieron con reactividad positiva células fusiformes alargadas del revestimiento alveolar, que pudieron corresponder a neumocitos tipo I. No encontramos una correlación clara entre el número de células positivas encontradas en los diferentes lóbulos pulmonares y el tropismo del virus no parece venir mediado por la localización del lóbulo (foto 18).

En los riñones encontramos células infectadas (histiocitos) con reactividad positiva tanto en glomérulos como en intersticio de las zonas cortical y medular renal (foto 19).

En los bazo en los que realizamos las técnicas de inmunohistoquímica se observó una marcada congestión con necrosis y desorganización tisular, así como deplección linfocitaria. Las células positivas no fueron muy numerosas, en su mayor parte de morfología macrófaga en pulpa roja o en zona marginal de las vainas linfocitarias (foto 20).

En las zonas de piel con lesiones tipo pápulas hemorrágicas, aparecieron células con inmunoreactividad en dermis profunda, tejido adiposo e hipodermis, tanto infiltradas en el tejido conjuntivo como alrededor de pequeños vasos.

Las células más frecuentemente infectadas en el hígado fueron células de Kupffer en la luz de los sinusoides y células macrófagas del estroma interlobulillar (foto 21).

Tabla 12.- Distribución de células infectadas en órganos.

	Cerdo 1v	Cerdo 2v	Cerdo 3v	Cerdo 4v	Cerdo 5v	Cerdo 6v
Ganglios	4	2/3	2/3	2	2/3	3
Tonsilas	4	4	nd	4	nd	4
Bazo	3	2	2	1	2	3
Pulmones	2/4	1/2	2/3	1/3	1/3	2/4
Hígado	1	2	2	1	2	2
Riñones	0/1	0/1	1	0/1	0/1	0/1
Intestino	0/1	0/1	nd	0	nd	0
Piel	3	nd	nd	nd	nd	nd
Timo	nd	0/1	nd	nd	nd	nd
Corazón	0	0	0	0	0	0

Los resultados expresan el número total de células positivas en 10 campos de 400x aumentos escogidos al azar. 0, ninguna célula positiva; 0/1, entre 1 y 5 células; 1, entre 5 y 15 células; 2, entre 15 y 40 células; 3, entre 40 y 100 células; 4, más de 100 células; nd no determinado.

La distribución de células positivas mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo frente al virus presentó una distribución orgánica más importante en órganos linfoides y pulmones, resultando sumamente curiosa la mayor presencia de células positivas en tonsilas, superior a la observada en ganglios linfáticos.

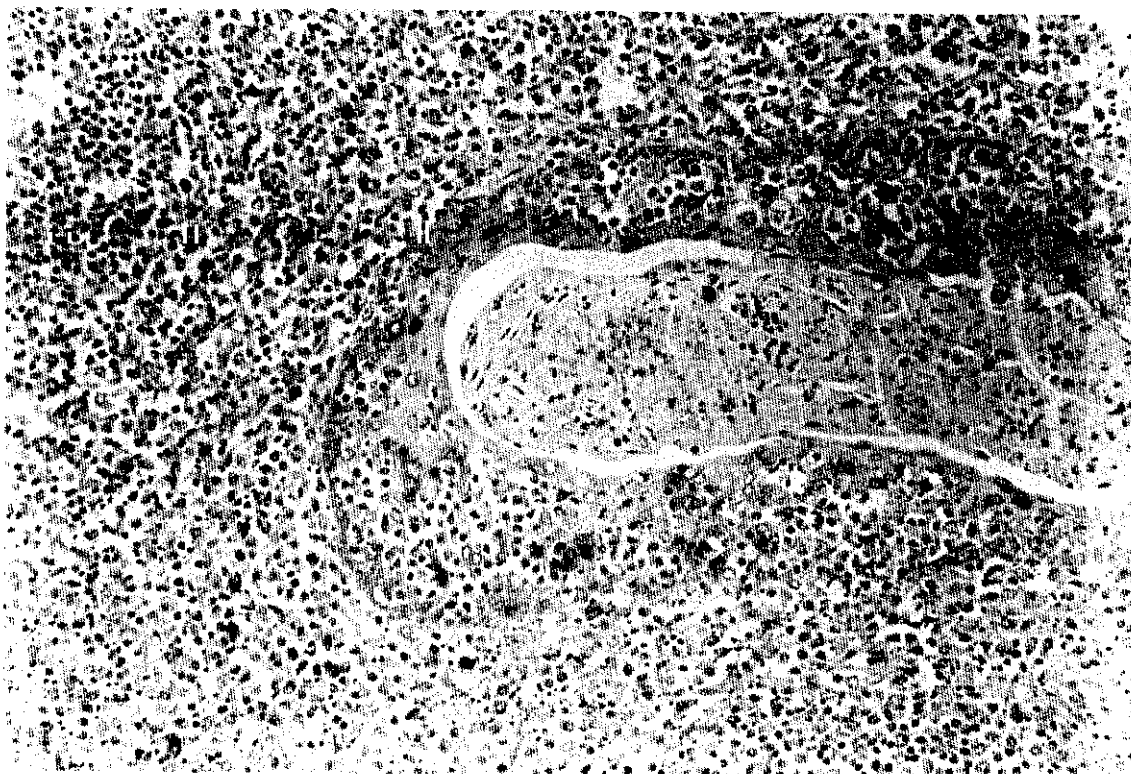


Foto 16.- Células con inmunoreactividad positiva al antígeno vírico. Tonsilas. PPA aguda. Extravidina-peroxidasa. 150x.

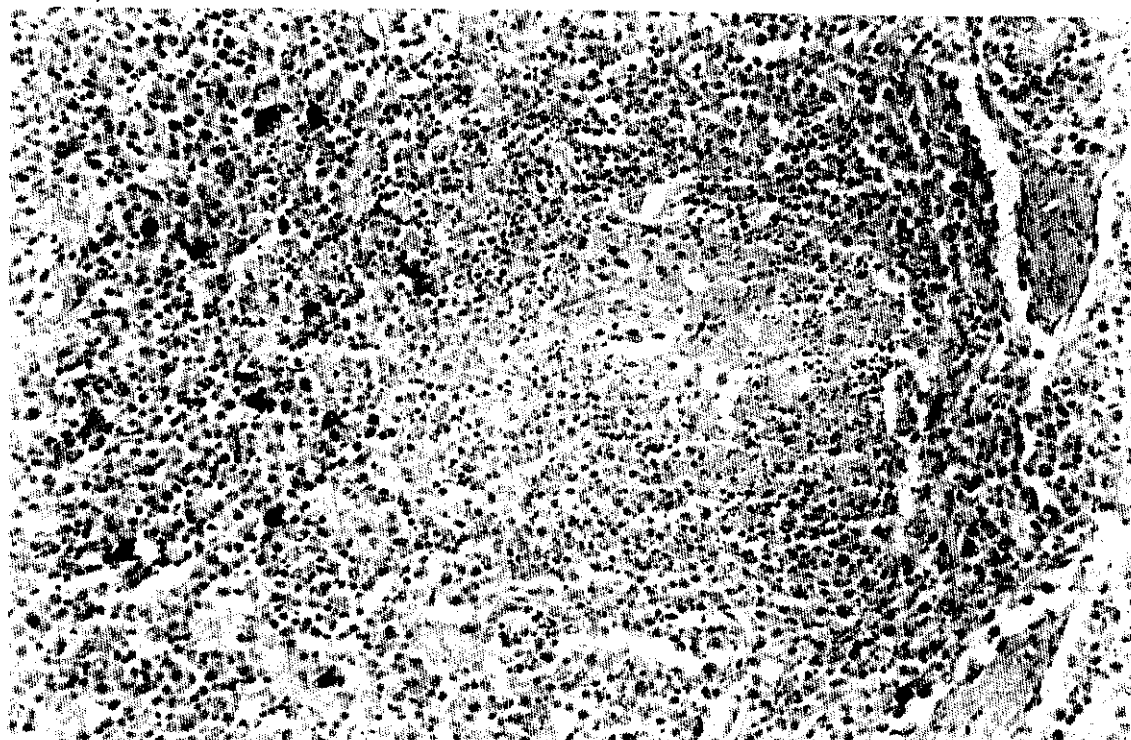


Foto 17.- Células con antígeno vírico zonas interfolliculares y en manto folicular de un ganglio. PPA aguda. Extravidina-peroxidasa. 150x.

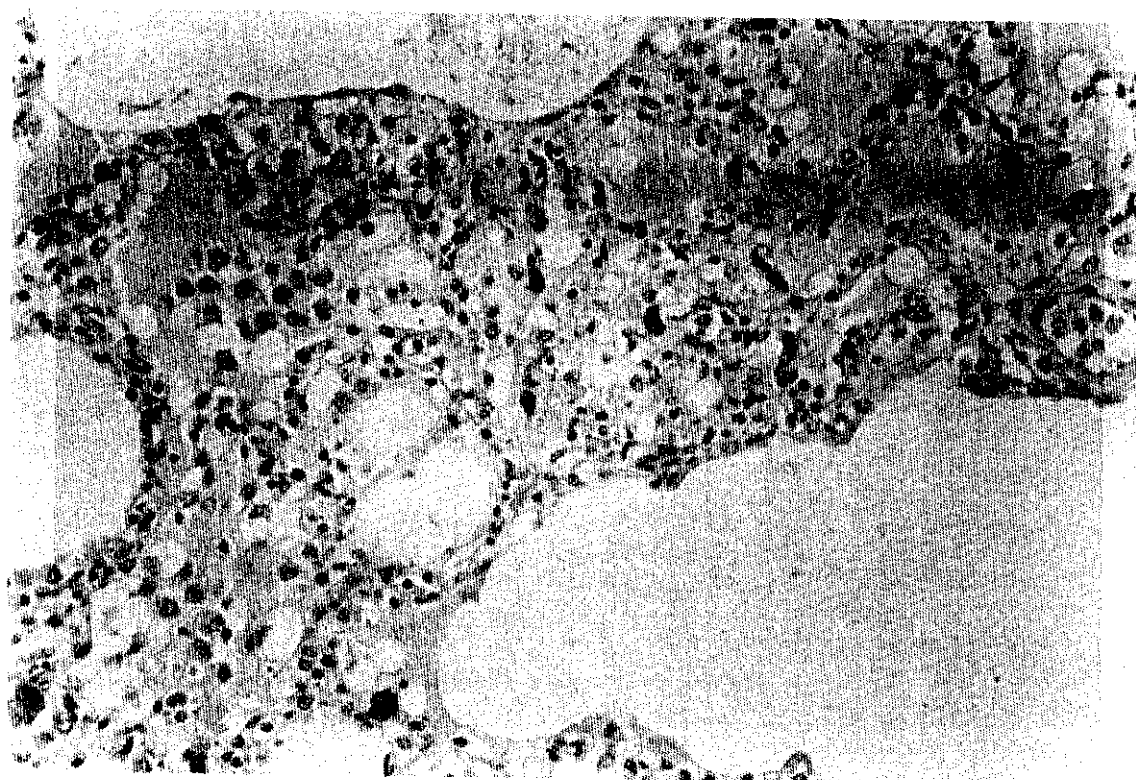


Foto 18.- Células infectadas en pulmón, en tabiques y en lucos alveolares. PPA aguda. Extravidina-peroxidasa. 198x

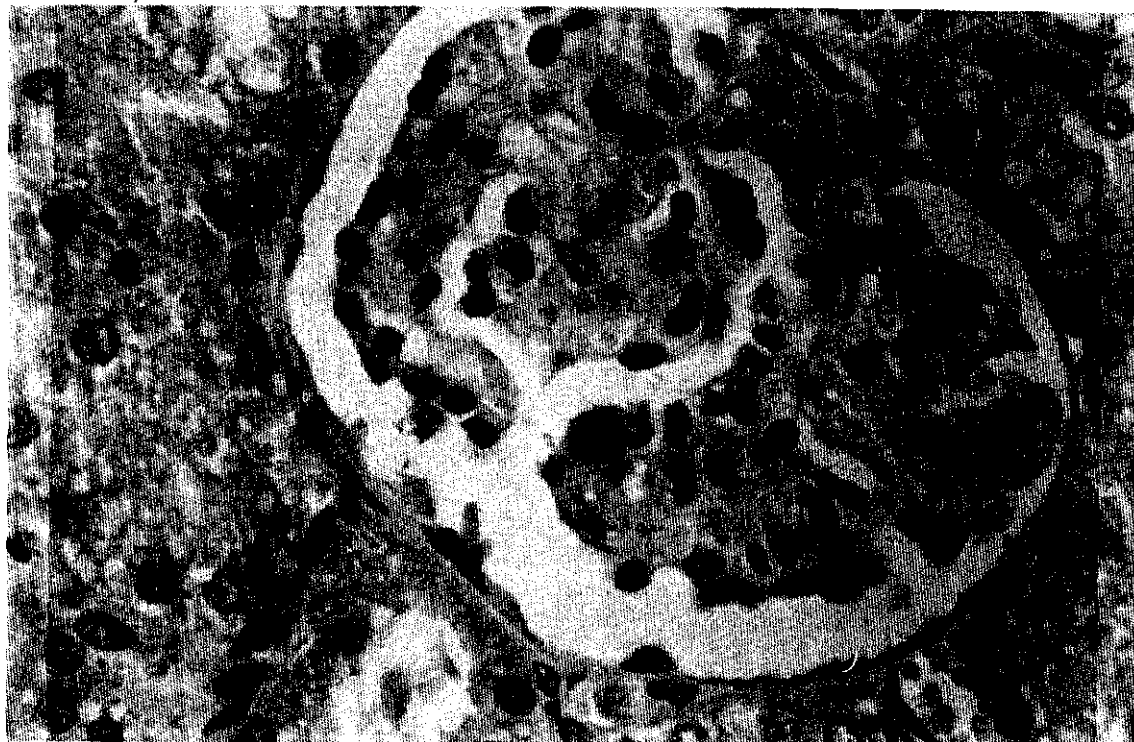


Foto 19.- Célula infectada en glomérulo renal. Obsérvese el cuerpo de inclusión perinuclear. PPA aguda. Extravidina-peroxidasa. 600x.

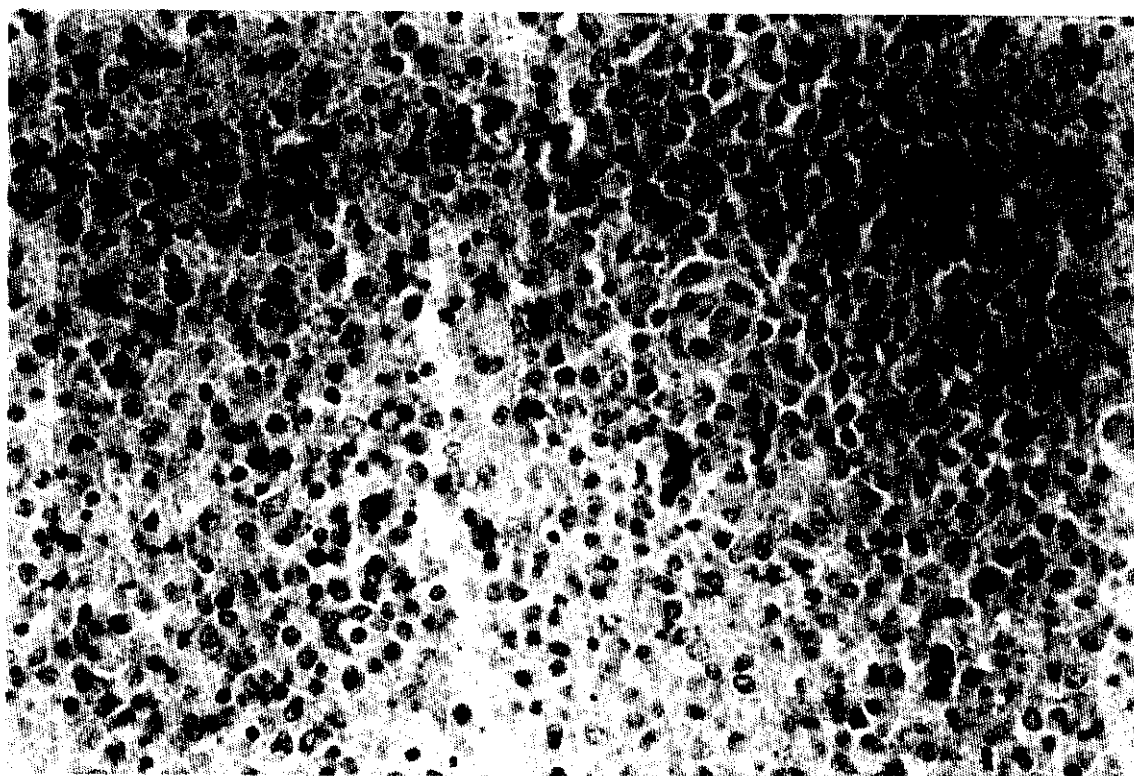


Foto 20.- Células infectadas en bazo, en pulpa roja y pulpa blanca. PPA aguda. Extravidina-peroxidasa. 300x

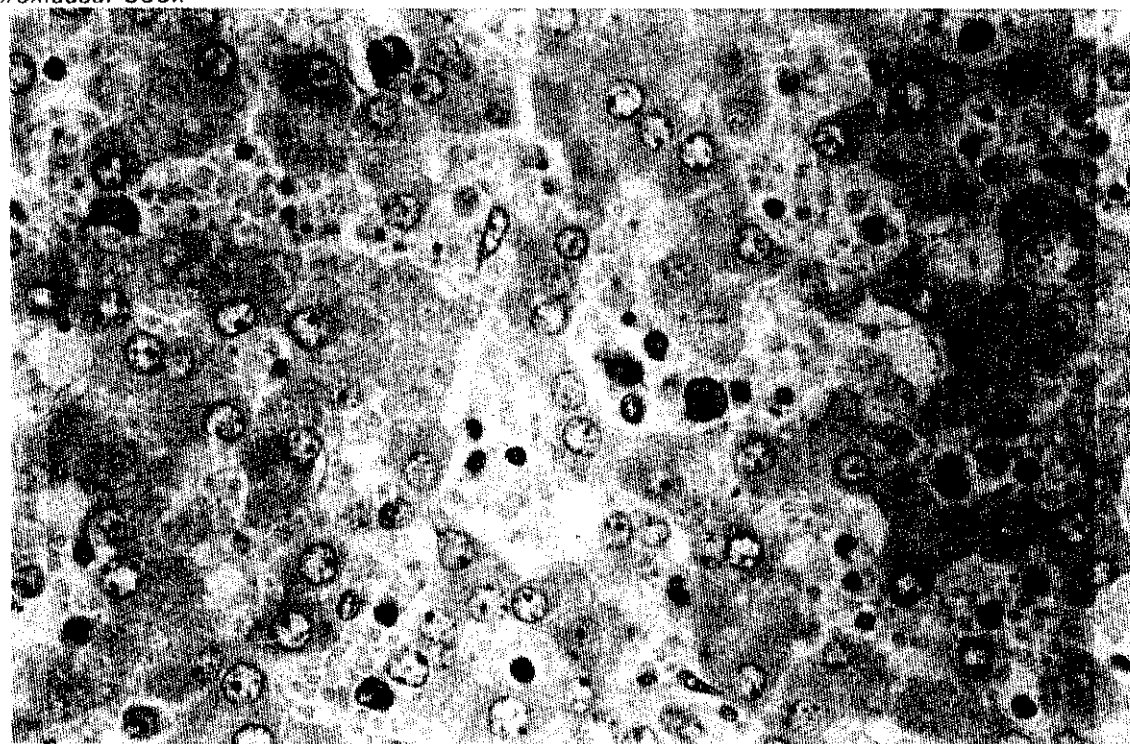


Foto 21.- Células infectadas en sinusoides hepáticos. De nuevo se observan los cuerpos de inclusión perinucleares. PPA aguda. Extravidina-peroxidasa. 396x.

3.B.c.- Valores hematológicos.-

3.B.c.1.- Recuentos globales de leucocitos.-

El recuento de los leucocitos evidenció una leucocitosis en el día 7 postinfección (37.200 células/mm³), con un aumento marcadamente menor al observado en el grupo de animales inmunocompetentes en ese mismo día (57.300 células/mm³) (fig. 46).

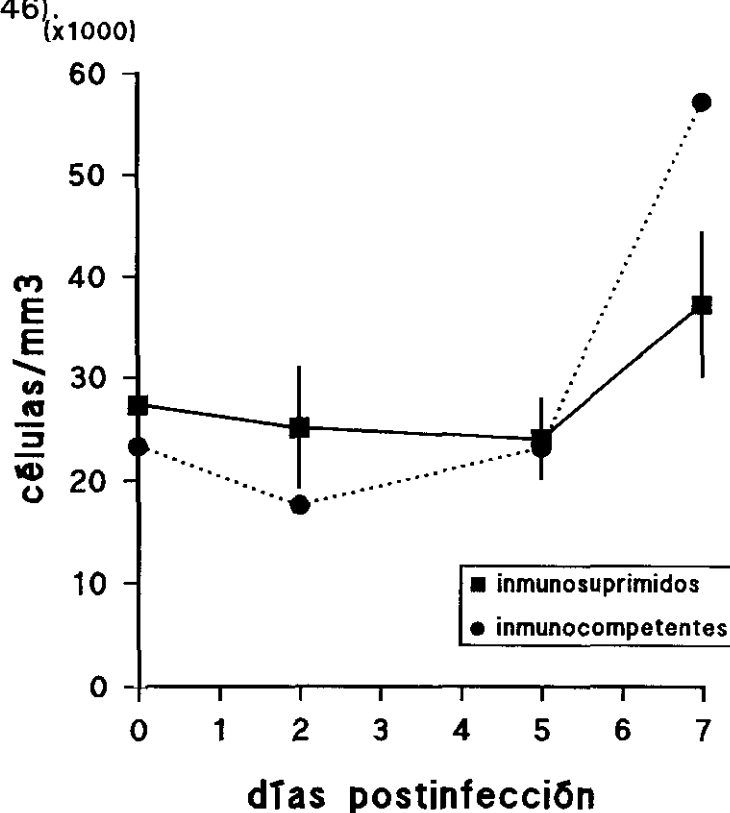


Fig. 46.- Recuento total de leucocitos en cerdos inmunosuprimidos infectados con el virus virulento E70. Comparación con el grupo de animales inmunocompetentes. Los valores se expresan como el número total de células/mm³ de sangre.

3.B.c.2.- Recuentos diferenciales de leucocitos. Células inmaduras.-

Por lo que respecta a los recuentos diferenciales, los neutrófilos

presentaron una proporción máxima en el día 5 postinfección, con cifras muy similares a la basal. Este porcentaje fue mínimo en el día 2 (19,75% ↓).

La proporción máxima de linfocitos fue observada en el día 2 (22,48% ↑), con un mínimo en el día 5 similar al valor inicial. A diferencia de los observado en los cerdos inmunocompetentes, no hubo una expresión máxima de linfocitos en el día 7.

La proporción periférica de neutrófilos jóvenes fue muy elevada en los día 5 y 7 postinoculación, con porcentajes del 13,11% y del 24% respectivamente. Estos valores fueron considerablemente mayores a los observados en el grupo de animales no inmunosuprimidos (fig. 47).

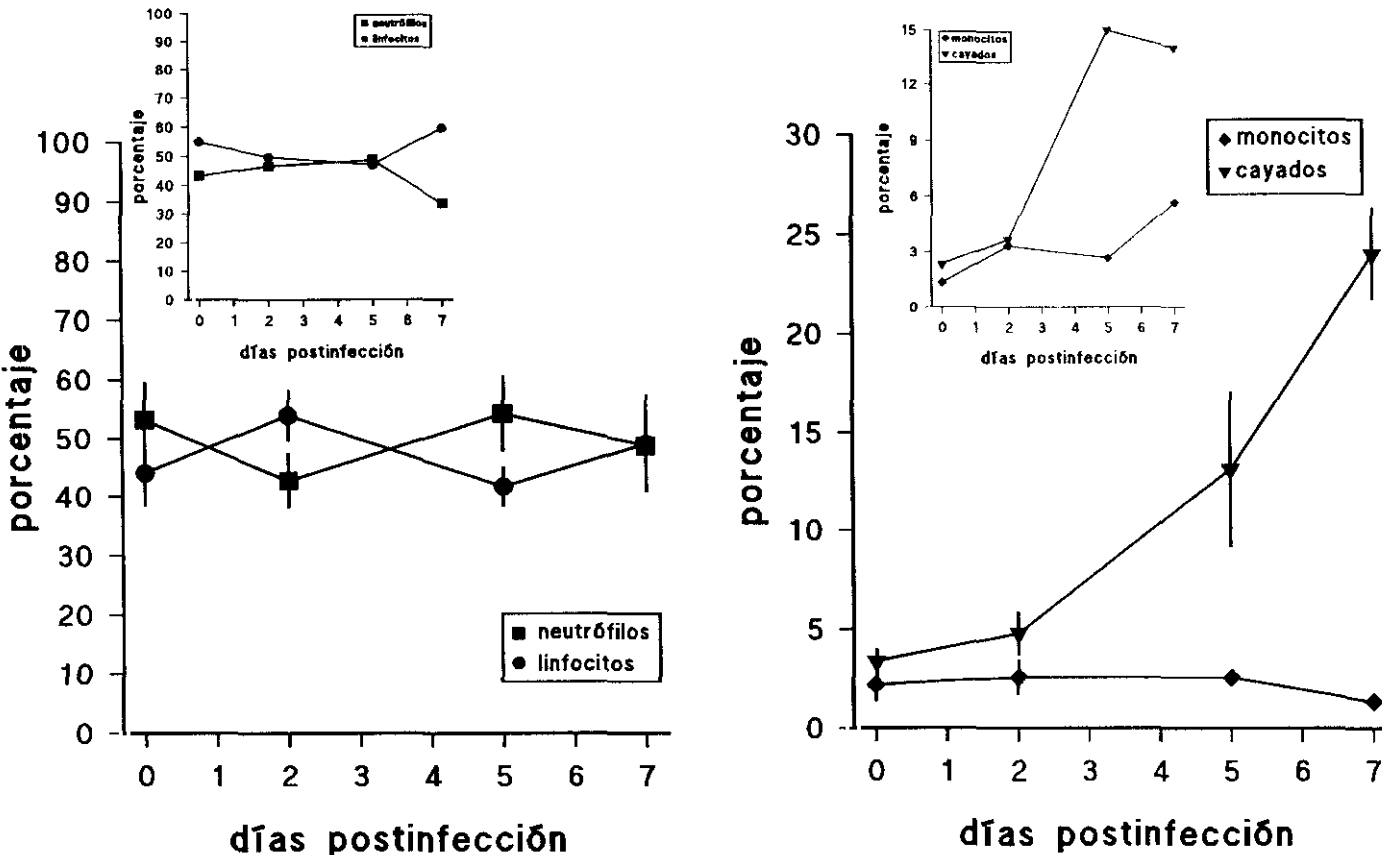


Fig. 47.- Recuento diferencial de leucocitos en cerdos inmunosuprimidos infectados con el aislado virulento E70. Comparación con los valores de cerdos no inmunosuprimidos.

3.B.d.- Poblaciones celulares de la respuesta inmune. Marcadores de activación.-

3.B.d.1.- Antígenos determinados en población de linfocitos.-

3.B.d.1.1.- Expresión del antígeno CD8 en linfocitos de sangre periférica.-

La proporción de linfocitos CD8⁺ en sangre periférica, valorada mediante el anticuerpo monoclonal PT81B no presentó un máximo en el día 7 postinfección, a diferencia de lo observado en animales inmunocompetentes. El porcentaje de esta población fue mínimo en el día 5 postinoculación (20,3% ↓) y de un nivel inferior al basal durante toda la infección.

Sin embargo, el porcentaje inicial de esta subpoblación fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los animales inmunosuprimidos en relación a los cerdos inmunocompetentes.

La fluorescencia media observada para esta antígeno fue bastante estable hasta el día 7, momento en el que se observó una expresión mínima (51,1% ↓). En este momento la diferencia con los cerdos inmunocompetentes fue significativa ($p < 0,05$) (fig. 48).

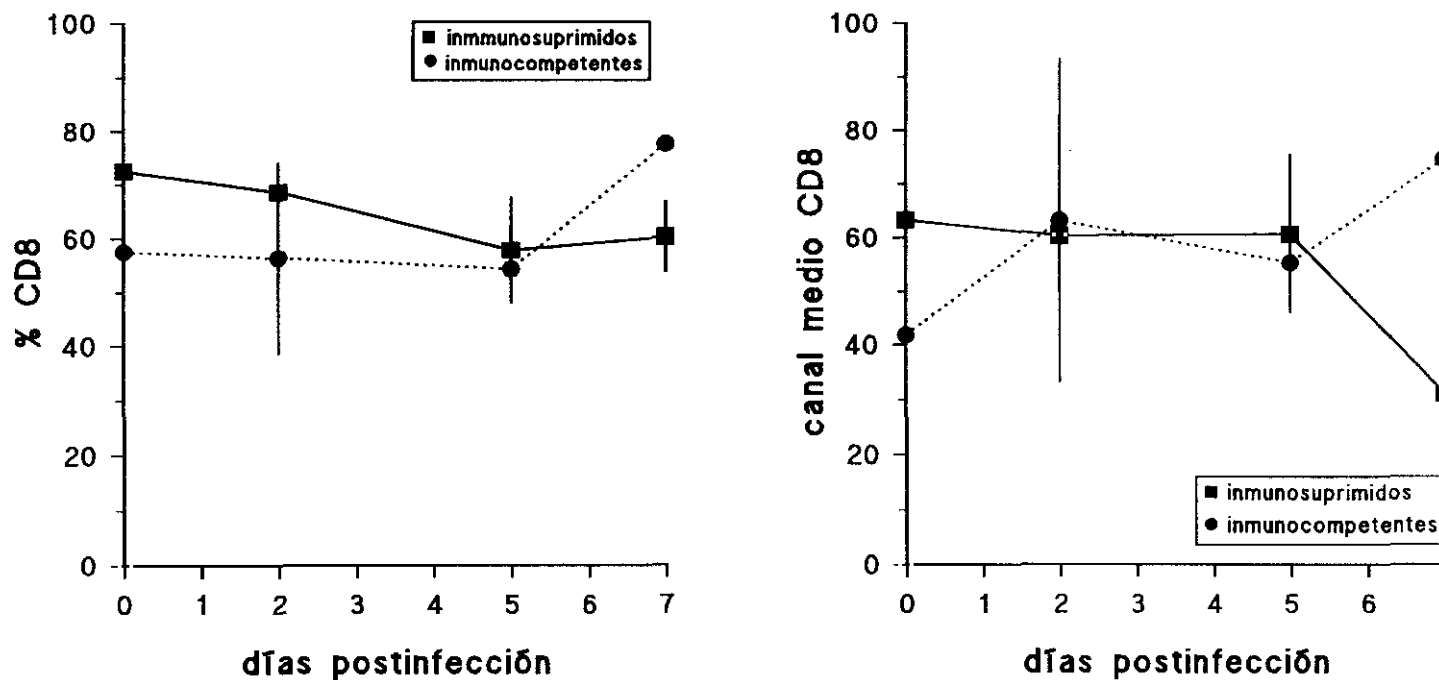


Fig. 48.- Variaciones en la proporción de células CD8⁺ y expresión media del antígeno en linfocitos de sangre periférica de cerdos inmunosuprimidos e infectados con el virus virulento E70.

3.B.d.1.2.- Expresión del antígeno CD4 en linfocitos de sangre periférica.-

Los linfocitos T CD4⁺ aumentaron porcentualmente hasta el día 5 (92%↑) respecto a la proporción inicial, para inmediatamente disminuir en el día 7 al final del desarrollo experimental (37,72%↓). No existió en ningún día una diferencia significativa con los valores obtenidos en cerdos inmunocompetentes y las variaciones fueron similares a las desarrolladas por estos últimos.

La fluorescencia media de las células CD4⁺ se incrementó inicialmente

desde el día dos, con un máximo en el día cinco postinfección (58,2% ↑), máximo que coincidió con el manifestado en los cerdos no tratados con CsA (fig. 49).

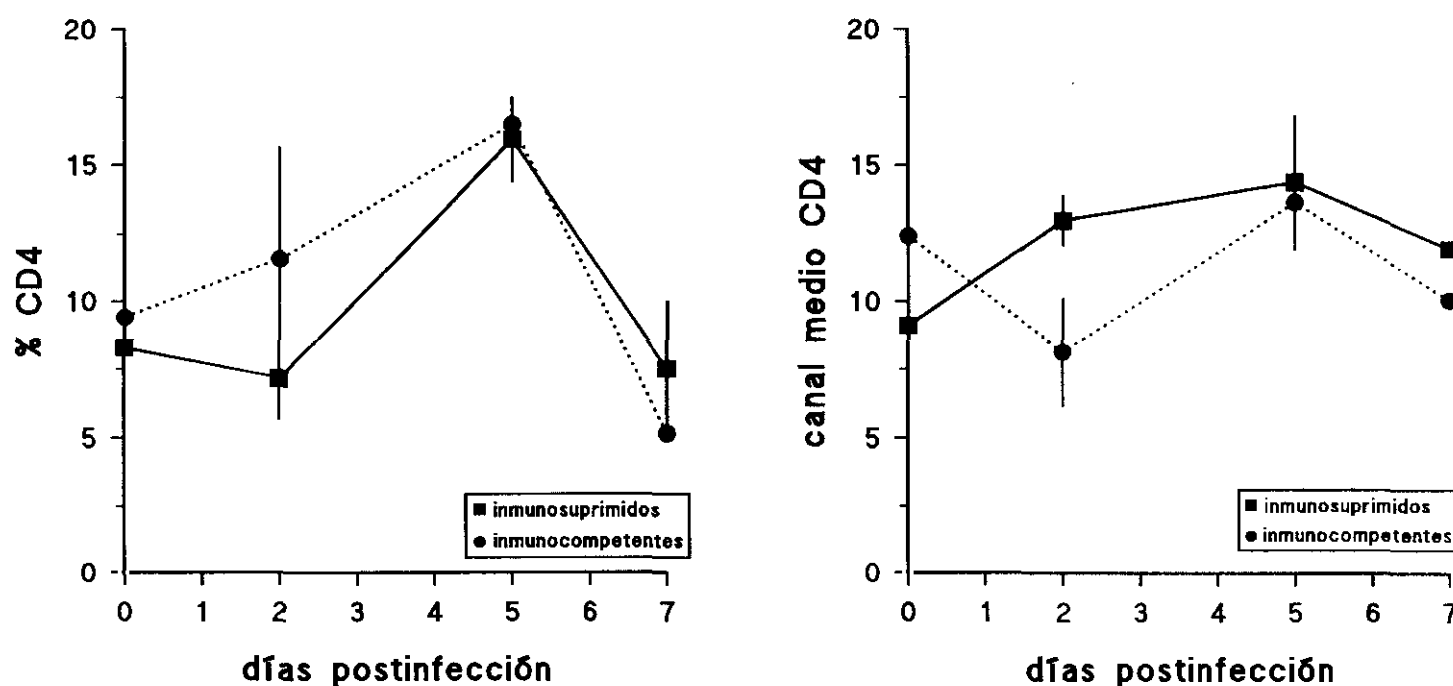


Fig. 49.- Porcentaje de células CD4⁺ y fluorescencia media del antígeno en linfocitos de sangre periférica durante la infección con el aislado virulento E70 en cerdos inmunosuprimidos.

3.B.d.1.3.- Células dobles positivas CD4-CD8 en sangre periférica.-

Los linfocitos T periféricos dobles positivos (CD4⁺CD8⁺) aparecieron en un porcentaje máximo en el día 5 (61,8% ↑) y mínimo en el día 7 (27,1% ↓) postinoculación, coincidiendo con lo observado en los animales inmunocompetentes (fig. 50).

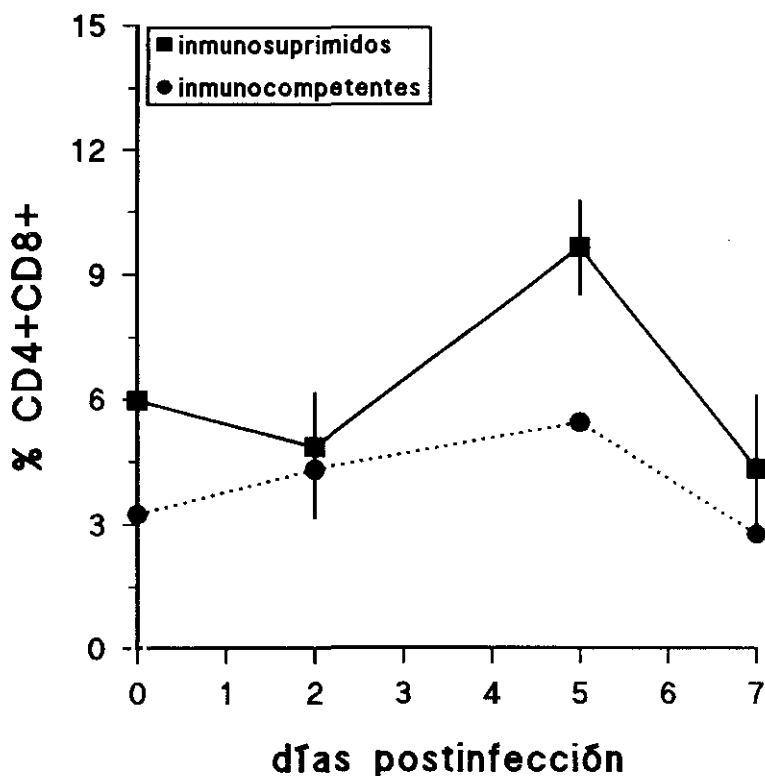


Fig. 50.- Proporción de linfocitos dobles positivos ($CD4^+$ - $CD8^+$) en sangre periférica de animales inmunosuprimidos infectados con el aislado virulento E70.

3.B.d.1.4.- Expresión del R-IL2 en linfocitos de sangre periférica.-

La fluorescencia media observada para el antígeno CD25 (fracción α del receptor de IL2) en linfocitos de sangre periférica evolucionó de forma similar al grupo de animales inmunocompetentes, es decir, disminuyó desde el día 2 postinfección, con una mínima expresión en el día 7 (61,1% ↓) (fig. 51).

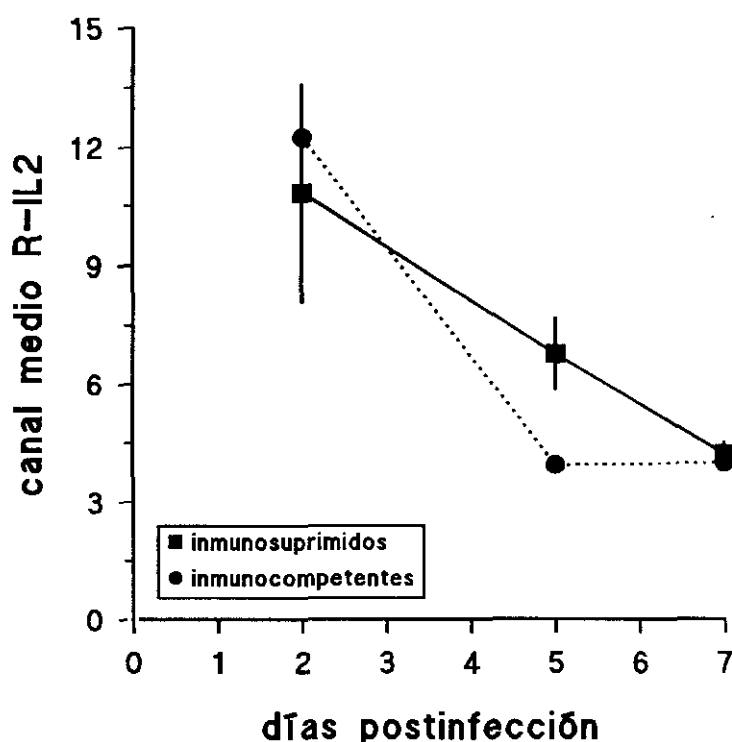


Fig. 51.- Fluorescencia media del antígeno CD25 (receptor de IL-2) en linfocitos de sangre periférica de cerdos inmunosuprimidos infectados con el virus virulento E70 .

3.B.d.1.5.- Linfocitos B en sangre periférica.-

Los linfocitos B manifestaron un aumento en su proporción en sangre periférica de un 65% durante el día 2 postinoculación y posteriormente retornaron a valores similares a los basales preinfección, sin disminuir excesivamente por debajo de los mismos (mínimo día 7 un 9,1% menor), a diferencia de lo observado en cerdos no inmunosuprimidos (mínimo en el día 7 un 40,5% menor).

La fluorescencia media de los linfocitos B (IgM⁺) evolucionó de forma similar en ambos grupos de animales, con un incremento inicial en el día 2 del 37% , y

una posterior disminución con un mínimo en el día 7 postinoculación (40,37% ↓) al final del período experimental (fig. 52).

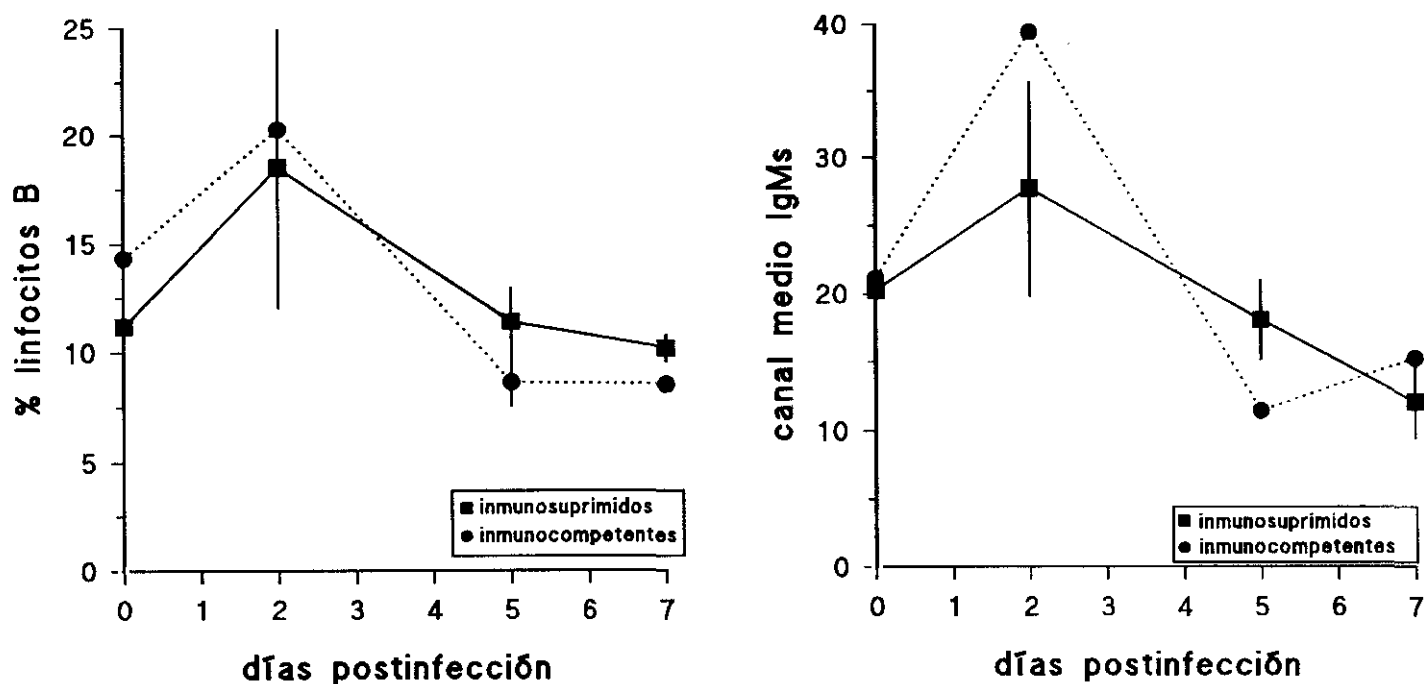


Fig. 52.- Variaciones en la proporción de células B y expresión media del antígeno IgM en linfocitos de sangre periférica de cerdos inmunosuprimidos infectados con el virus virulento E70.

3.B.d.2.- Antígenos determinados en población de células mononucleares.-

3.B.d.2.1.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-I o SLA-I.-

La valoración del antígeno mayor de histocompatibilidad tipo I (SLA-I), realizada tras el estudio del canal medio de fluorescencia en células mononucleares, presentó un mínimo (20% ↓) en el día 7 postinoculación, como ya se observó en

cerdos inmunocompetentes. El incremento temprano de la expresión de este antígeno observado en los animales no inmunosuprimidos no se presentó en este grupo (fig. 53).

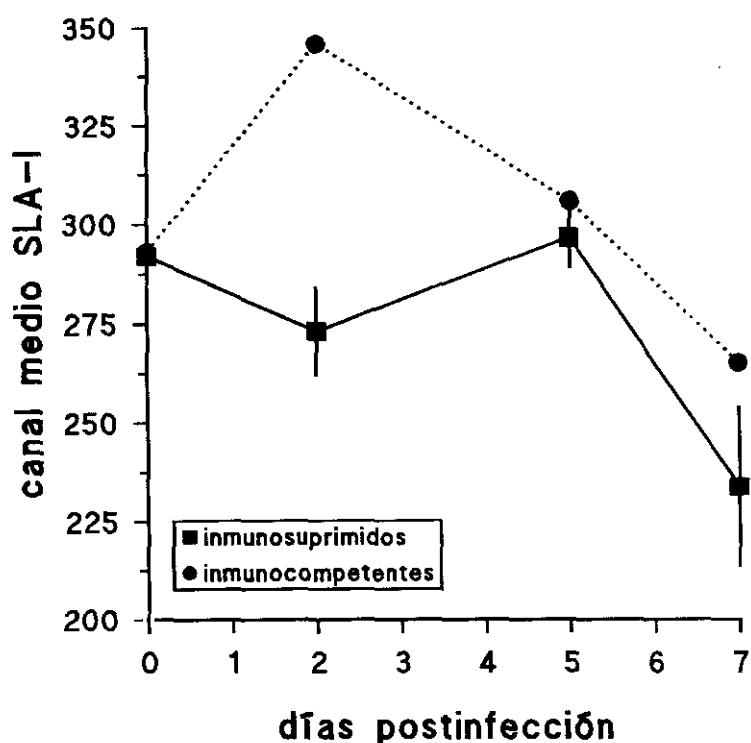


Fig. 53.- Fluorescencia media del antígeno SLA-I en células mononucleares de sangre periférica de animales inmunosuprimidos infectados con el aislado virulento E70.

3.B.d.2.2.- Antígenos de histocompatibilidad. MHC-II o SLA-II.-

El porcentaje de células mononucleares que expresaban el antígeno SLA-II en su superficie disminuyó significativamente ($p < 0,002$) en el día 2 (12,3% ↓), con un mínimo observado en el día 7 (42% ↓). La fluorescencia media fue máxima en el día 5 (26% ↑), con un mínimo en el día 7 postinfección (18,7% ↓) (fig. 54).

Por lo tanto, la expresión de SLA-II fue diferente en animales inmunosuprimidos respecto a inmunocompetentes en el día 7 postinfección. En ese momento en el primer grupo disminuyeron la proporción de células SLA-II⁺ y la fluorescencia media de las mismas, mientras que el 2º grupo presentó un máximo de ambos valores.

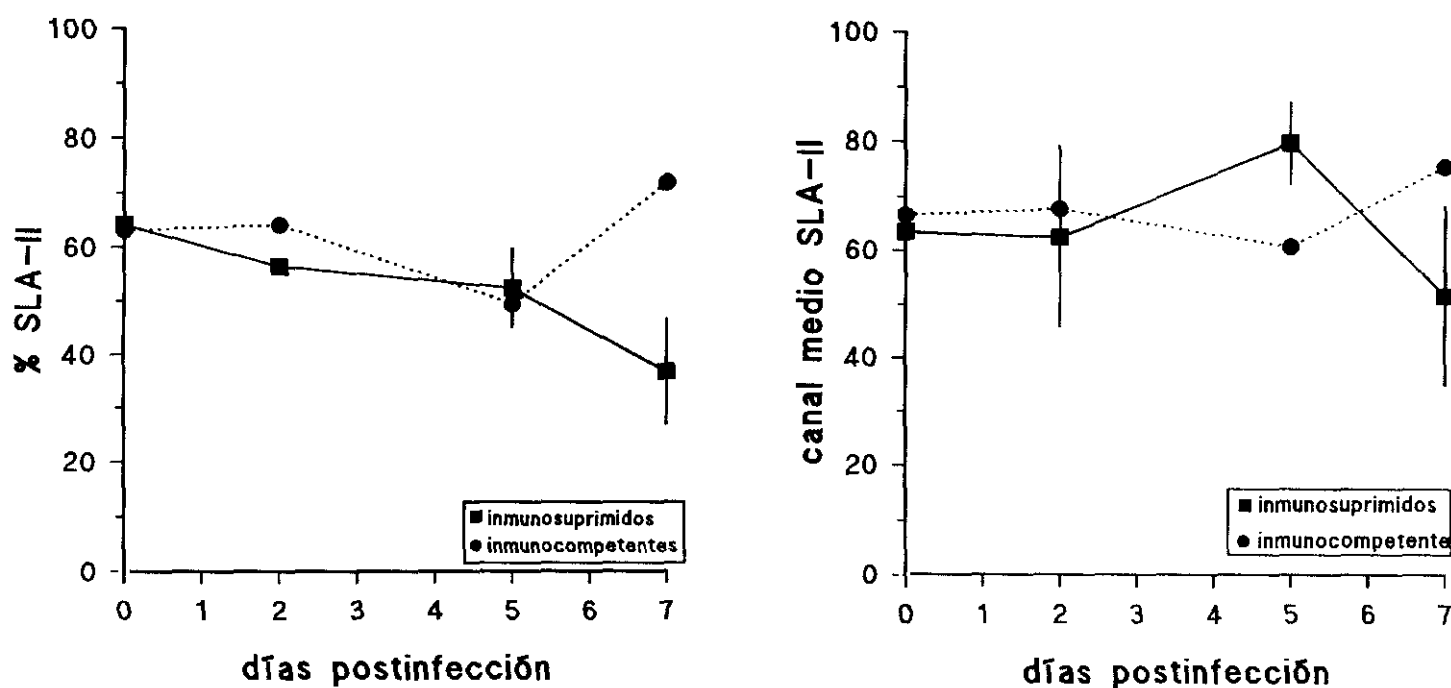


Fig. 54.- Variaciones en el porcentaje de células SLA-II⁺ y expresión media del antígeno en linfocitos de sangre periférica en cerdos inmunosuprimidos infectados con el virus E70 virulento.

3.B.d.2.3.- Monocitos/macrófagos en sangre periférica.-

En los cerdos inmunosuprimidos no se observó una estimulación inicial del porcentaje de esta población tras la infección, sino sólo un aumento mucho menor de la fluorescencia media. Tampoco encontramos la disminución brusca del día 7

postinoculación observada en los animales no inmunosuprimidos, sino que aumentaron los porcentajes un 10% sobre los basales.

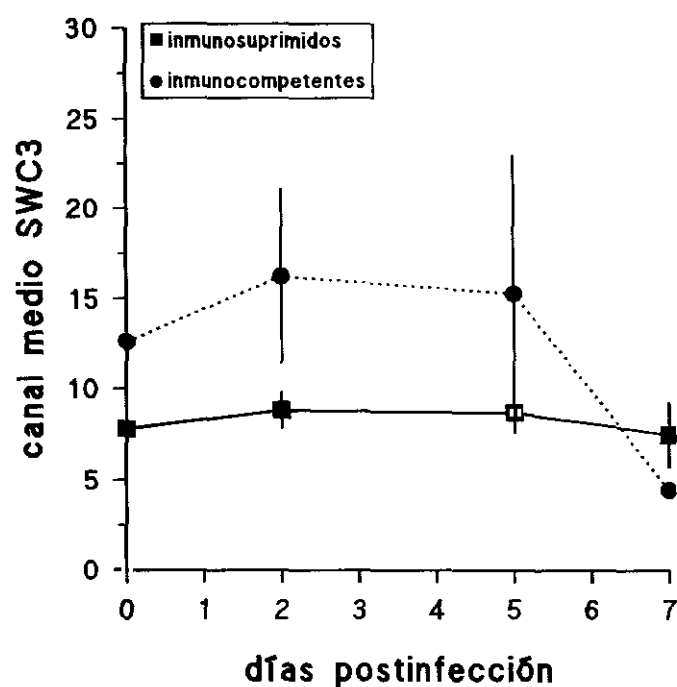
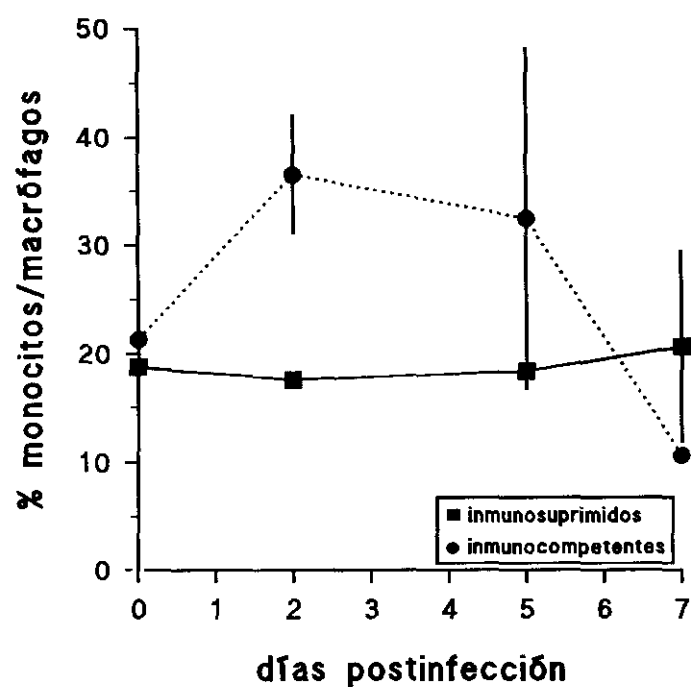


Fig. 55.- Porcentaje de células SWC_3^+ y fluorescencia media del antígeno en células mononucleares de sangre periférica de cerdos inmunosuprimidos infectados con virus E70 virulento.

B.- ESTUDIOS *in vitro* SOBRE PATOGENIA DE LA PPA

1.- MODIFICACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS SUPERFICIALES EN CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE

1.A.- Expresión de antígenos celulares: SLA-II DRw, SLA-I, CD44, CD11a.

Se estudió la expresión de algunos antígenos superficiales en monocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo, tras la realización de una ventana de adquisición de datos en la zona correspondiente a la distribución de estas células.

El antígeno de histocompatibilidad SLA-II DRw presentó niveles de fluorescencia media inferiores a las 14 y 24 horas postinfección, tanto en la infección con el aislado atenuado como con el virus virulento. Con el virus virulento se observó además una disminución del porcentaje de macrófagos que expresan SLA-II.

La disminución de la fluorescencia media en macrófagos se observó tanto en macrófagos maduros (infectados tras 4 días en cultivo), como en monocitos inmaduros (infectados de inmediato tras su extracción).

Dada la importancia de este antígeno en la respuesta inmune, se analizó su expresión durante la infección con otros aislados víricos (virulentos y atenuados) a las 24 horas postinfección y a una multiplicidad de infección $MI=0,5$ en macrófagos maduros. Todos ellos desarrollaron una disminución de la fluorescencia media del SLA-II en los macrófagos infectados.

En los modelos víricos E70 y E75, el homólogo atenuado produjo una disminución mayor de la fluorescencia media que el homólogo virulento. Sin embargo, en el caso del modelo vírico 608, el virus virulento produjo una mayor inhibición que su homólogo atenuado.

El descenso de mayor cuantía se produjo con el virus 646 virulento

(69,75%↓), siendo la disminución más moderada la desarrollada por el virus E70 virulento (43,2%↓) (fig. 56).

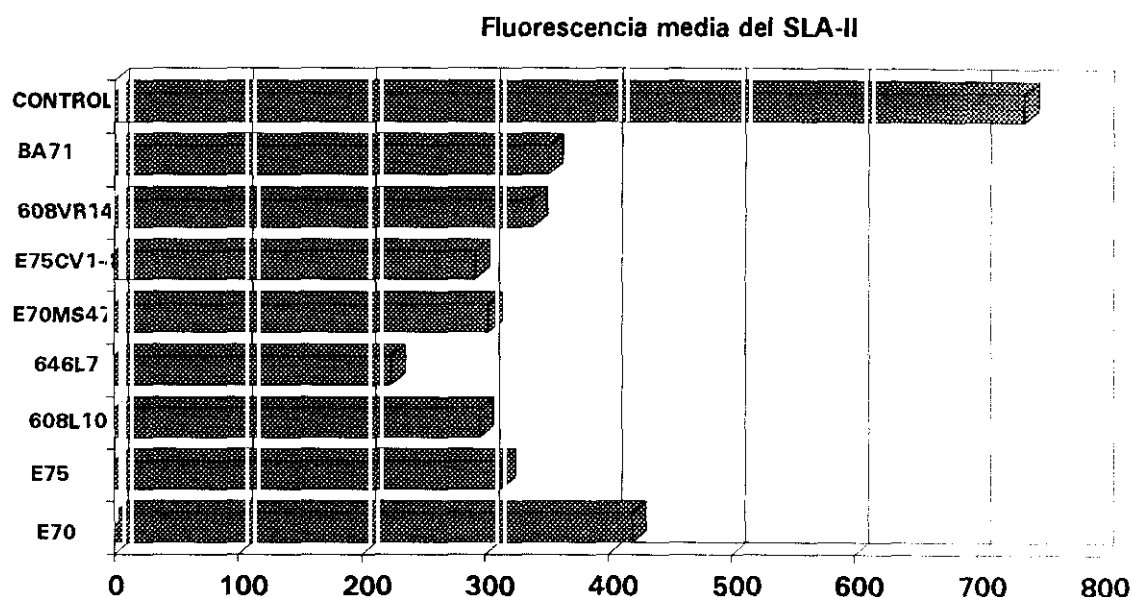


Fig. 56.- Expresión media del SLA-II en membrana de macrófagos infectados *in vitro* con diferentes aislados del VPPA durante 24 horas.

El análisis de la expresión de SLA-I registró un incremento de la fluorescencia media en cultivos de macrófagos infectados. Este incremento se observó para todos los aislados probados a las 24 horas postinfección y con una multiplicidad de infección de 0,5. Los mayores incrementos se presentaron con los aislados E70 virulento y BA71VR2 atenuado (119,5%↑). A estos mismos tiempos y multiplicidades de infección, el menor incremento fue el desarrollado por el virus E70MS47 (20,3%↑).

Cuando la expresión se valoró en monocitos de sangre periférica, observamos un efecto diferente entre el aislado virulento E70 y el atenuado E75, de forma que con el E70 la expresión de SLA-I siempre fue menor que la de células

no infectadas (23,5% ↓); mientras que en el caso del aislado atenuado la expresión apareció marcadamente aumentada (86,17% ↑) (fig. 57).

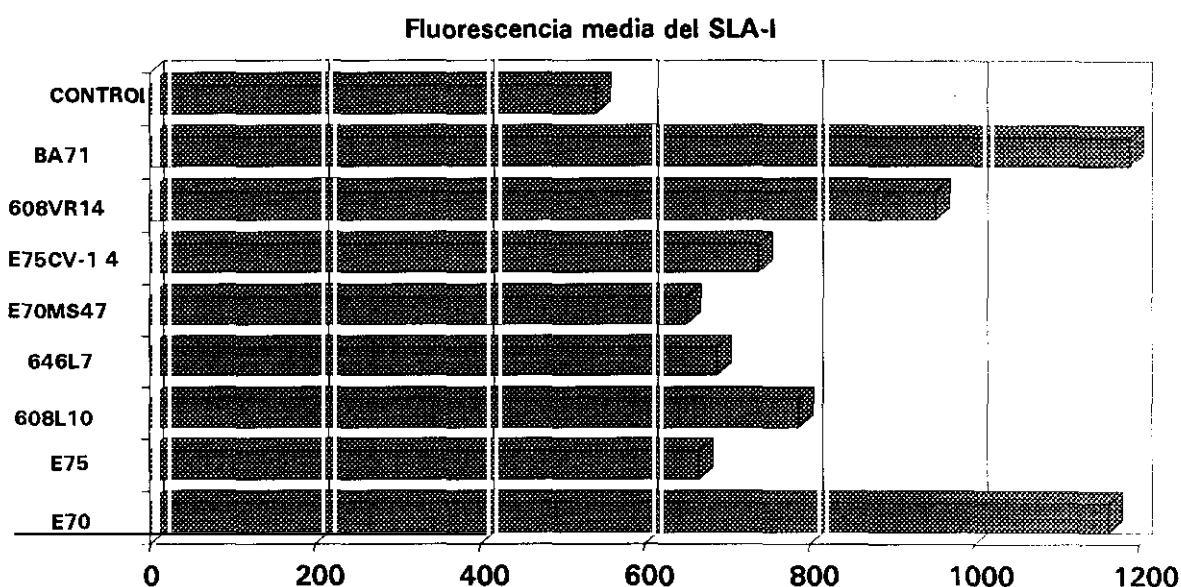


Fig. 57.- Expresión media de SLA-I en membrana de macrófagos infectados con diferentes aislados del VPPA durante 24 horas.

Las variaciones observadas en el porcentaje de células positivas para algunos antígenos superficiales, en la población de monocitos, fueron en general poco importantes para antígenos como CD44 y CD11a. Sin embargo, sí se modificó el canal medio de fluorescencia presentado por las células que expresaron estos antígenos en su superficie.

Pudimos apreciar un incremento de la expresión media del antígeno CD11a a las 24 horas postinfección en los macrófagos infectados con ambos aislados (44% ↑ con el virus atenuado y 30,6% ↑ en el caso del virus virulento, sobre los porcentajes observados en cultivos sin infectar).

Por su parte el CD44 presentó variaciones menos intensas respecto a las células sin infectar, estando disminuida su expresión en los cultivos infectados durante 24 horas (8%↓ en los cultivos infectados con el aislado E75CV₁-4, y 7,6%↓ en los cultivos infectados con el aislado E70 virulento).

2.- INTERFERENCIA DEL VPPA CON FUNCIONES LINFOCITARIAS

2.A.- Inhibición de la blastogénesis en células estimuladas con mitógenos.-

Células extraídas de sangre periférica de cerdos infectados con los modelos víricos E75CV₁-4 atenuado y E70 virulento, fueron procesadas para su posterior cultivo en placas, donde se las sometió a estimulación con un mitógeno Concanavalina A, para comprobar si se mantenía la capacidad de respuesta proliferativa de las células frente a controles procedentes de animales sin infectar.

La extracción se realizó el día 7 en el caso del aislado virulento y entre los días 14-16 en el caso de los animales infectados con el aislado atenuado, debido a la diferente cinética de ambos virus.

2.A.1.- Incorporación de timidina tritiada en células de cerdos infectados.-

Midiendo la incorporación de timidina tritiada se obtuvieron los siguientes resultados:

Con células procedentes de animales infectados con el virus virulento no se observó ninguna respuesta proliferativa independientemente de la concentración de ConA utilizada. En el caso de los animales infectados con virus atenuado sólo se observó una respuesta proliferativa a elevadas concentraciones del mitógeno (10 µg/ml).

Los mismos experimentos se realizaron en cerdos sometidos a un protocolo de inmunosupresión con Ciclosporina A (CsA).

Cuando se estudió la respuesta de los cerdos infectados con el aislado virulento que habían sido inmunosuprimidos, obtuvimos una discreta respuesta blastogénica a bajas concentraciones de ConA ($2,5 \mu\text{g/ml}$) similar a la de células de un cerdo sin infectar; pero no se obtenía respuesta alguna a dosis elevadas del mitógeno. Los linfocitos de sangre periférica de cerdos inmunosuprimidos e infectados con el aislado E75CV₁-4 presentaron una reducción muy importante de la capacidad de proliferación ante este mitógeno (fig. 58).

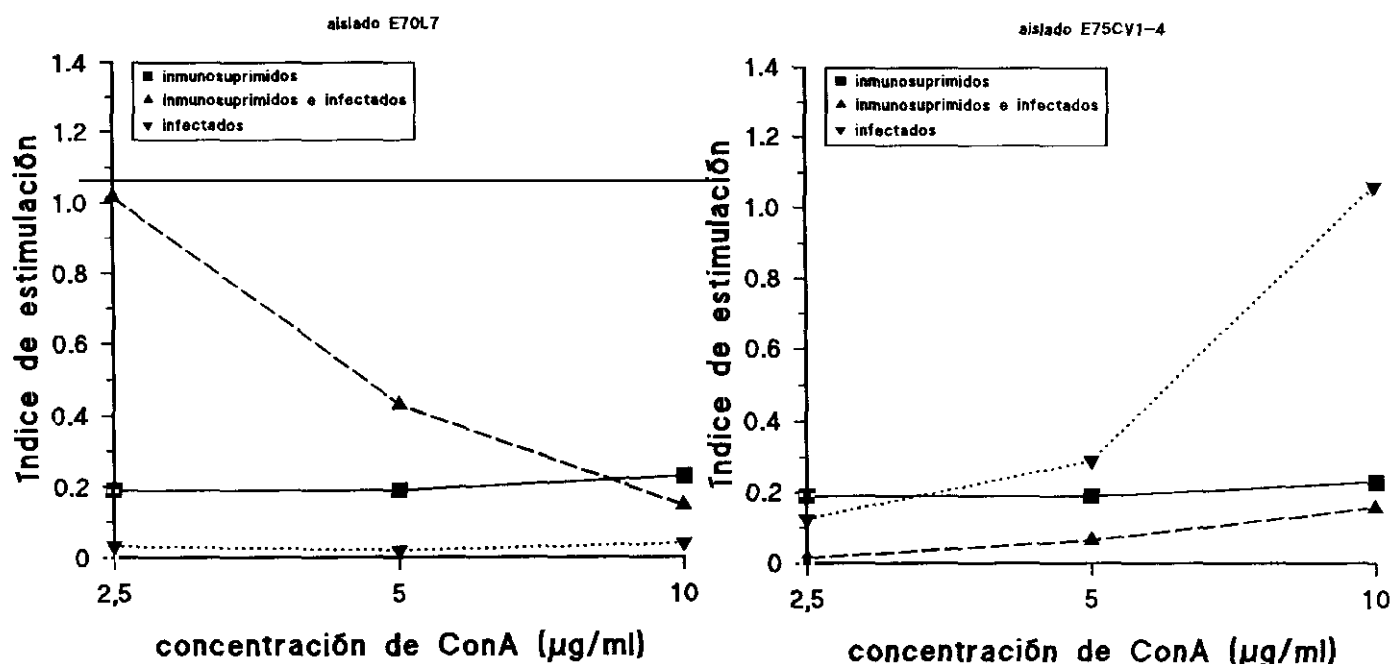


Fig. 58.- Incorporación de timidina tritiada en células mononucleares de cerdos infectados con VPPA tras la estimulación con el mitógeno Concanavalina A. Los valores se expresan como el índice de estimulación con respecto a la timidina incorporada en células de cerdos no infectados. El panel izquierdo representa las células extraídas de cerdos infectados con el aislado virulento E70, el panel derecho representa los resultados de los cerdos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4.

2.A.2.- Expresión del receptor de IL2 en células de cerdos infectados.-

La respuesta celular a la lectina Concanavalina A se valoró también mediante el estudio de la expresión del antígeno CD25 o receptor de IL-2 en la membrana de

linfocitos procedentes de cerdos infectados estimulados en cultivo.

Esta expresión se valoró utilizando el anticuerpo monoclonal K231-3B2 frente a la fracción α o Tac del receptor, y valorando la fluorescencia media de las células positivas a través de la técnica de citometría de flujo ya descrita.

Este antígeno Tac sólo se detecta en linfocitos activados ante diversos estímulos (Bailey *et al*, 1992). Los linfocitos activados que expresan dicha fracción del receptor aumentan la respuesta blastogénica mediante autoestimulación con IL-2.

En células mononucleares procedentes de un animal testigo mantenidas en cultivo en presencia del mitógeno ConA, existía un claro incremento de la expresión del receptor de IL-2. Esta expresión fue máxima a concentraciones de 5 μ g/ml con un aumento del 170,6% sobre la expresión en células sin mitógeno.

En cultivos de mononucleares estimulados del mismo modo con el mitógeno pero procedentes de cerdos infectados con virus virulentos o atenuados se observó una disminución de la expresión del CD25; disminución máxima de un 49,08% en células de cerdos infectados con el virus virulento y de un 51,52% en células de cerdos infectados con el aislado atenuado (para una concentración de 5 μ g/ml de ConA). En condiciones de cultivo sin estímulo se observó una mayor expresión del R-IL2 espontánea en los cerdos infectados con el virus virulento sobre las células de animales no infectados (102,42%↑).

El efecto de un inmunosupresor como la ciclosporina sobre la síntesis de ciertas citoquinas supone una inhibición de la expresión del receptor de IL-2 en linfocitos normales. Cuando valoramos esta expresión en células de sangre periférica de un animal testigo y tratado con el inmunosupresor se observó una reducción de la expresión del receptor de IL-2 tanto en células sin estimular, como bajo la acción de un mitógeno (ConA 5 μ g/ml). Esta reducción alcanzó un 62,5% en el momento de mayor expresión del CD25 en células un animal no tratado. En las células procedentes de animales infectados con el aislado atenuado o virulento e inmunosuprimidos, también hubo un descenso en la fluorescencia media del

receptor para las diferentes concentraciones de ConA utilizadas, siendo las diferencias menores a elevadas concentraciones de ConA (10 $\mu\text{g/ml}$) (fig. 59).

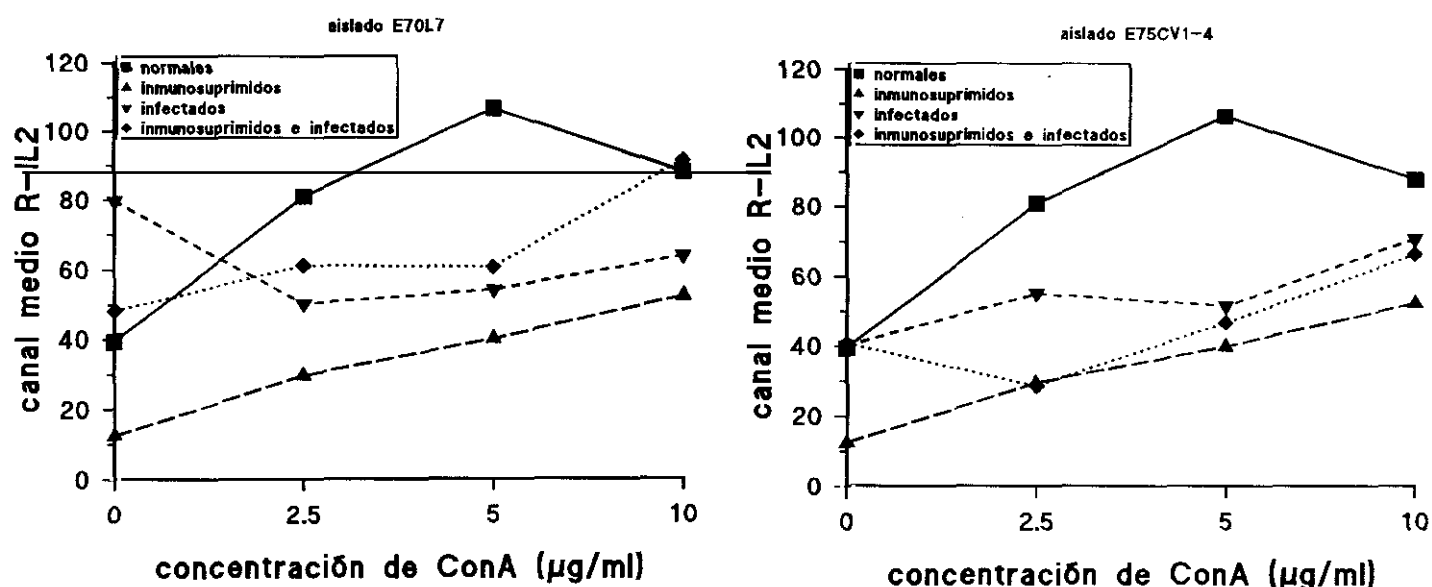


Fig. 59.- Expresión media del receptor de IL-2 en células mononucleares de cerdos infectados tras la estimulación con el mitógeno Concanavalina A. El panel izquierdo representa la expresión en células extraídas de cerdos infectados con el virus virulento E70; el panel derecho representa la expresión en células de animales infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4.

2.A.3.- Incorporación de timidina tritiada en células infectadas *in vitro*.-

Con la finalidad de analizar más en detalle las alteraciones de la capacidad blastogénica de las células de la respuesta inmune durante la infección *in vivo* (2.A.1), se estudió la capacidad de respuesta a diversos estímulos de células mononucleares de sangre periférica infectadas *in vitro* con diferentes aislados de

virus.

Se midió la incorporación de timidina tras añadir $2 \mu\text{g/ml}$ de concanavalina A en el medio de las células mantenidas en cultivo, obteniéndose una incorporación de $4,4 \times 10^5$ cuentas por minuto (cpm).

Todos los aislados del virus probados disminuyeron la respuesta proliferativa a la lectina ConA. La inhibición más marcada se obtuvo con el aislado E70, tanto virulento como adaptado a línea celular: disminución de 4×10^5 y $4,4 \times 10^5$ cpm, respectivamente. Con el aislado atenuado E75CV₁-4 la disminución de cuentas fue menor : $3,5 \times 10^5$ cpm (fig. 60).

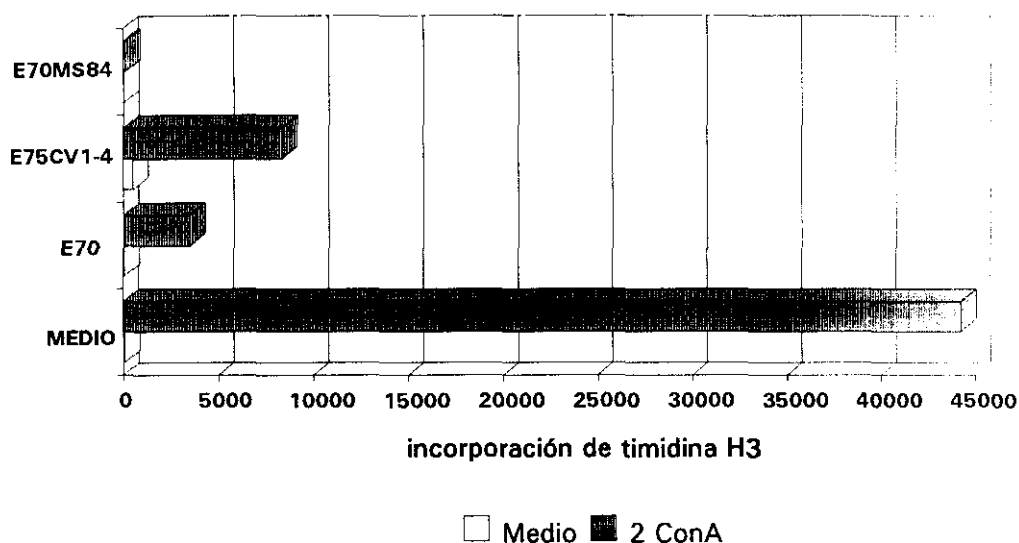


Fig. 60.- Incorporación de timidina tritiada en cultivo de células mononucleares infectadas con diferentes aislados del VPPA. Los valores se expresan en cuentas radioactivas por minuto (cpm).

Se comprobó si el efecto era reversible añadiendo al medio un nuevo estímulo mitogénico como la citoquina IL-2 (concentración de 60 unidades/pocillo), no se recuperó la respuesta en células infectadas con el virus E70 virulento ($\uparrow 10^3$ cpm) y sin embargo se obtenía una sobreestimulación en los pocillos infectados con el virus atenuado E75CV₁-4 ($\uparrow 2 \times 10^5$ cpm); incluso superior a la respuesta de las células sin infectar.

La adición de ciclosporina A en el medio a una concentración de 200 y 400 ng/ml incidió de forma negativa sobre la blastogénesis en todos los modelos víricos probados (fig. 61).

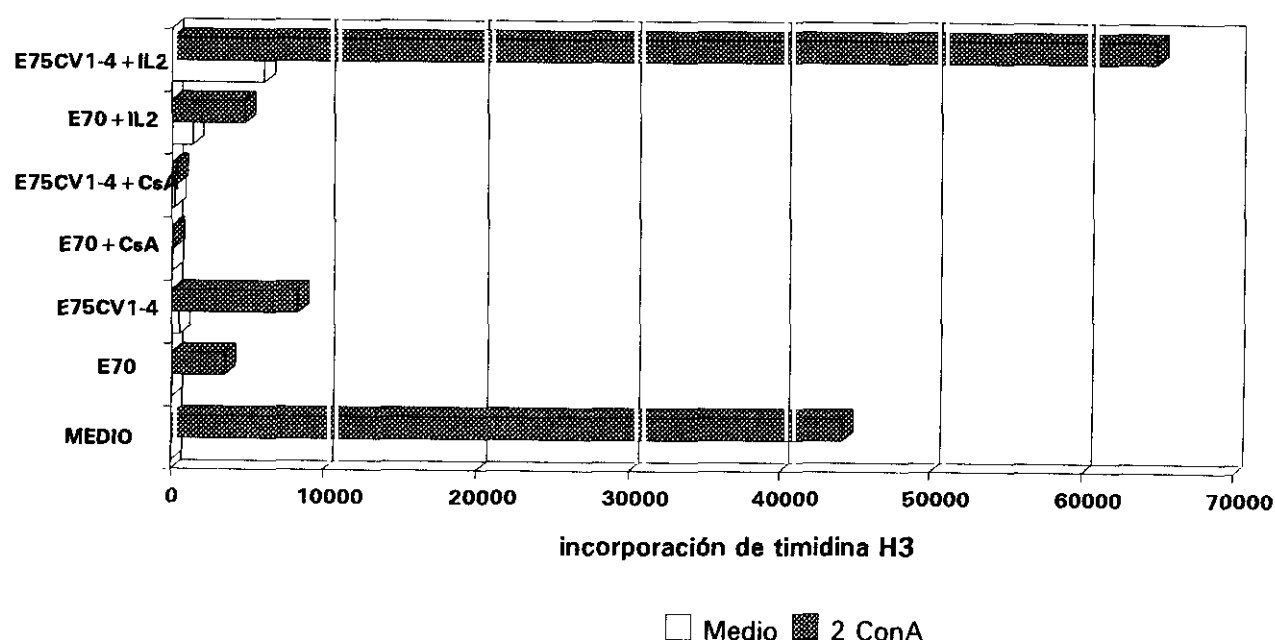


Fig. 61.- Incorporación de timidina tritiada en cultivo de células mononucleares infectadas con diferentes aislados víricos y estimuladas con mitógeno (ConA) o citoquina (IL-2). Los valores se expresan en cuentas radioactivas por minuto (cpm).

2.B.- Efecto del VPPA sobre el ciclo del ADN en linfocitos.-

Se valoró el ciclo de ADN en células mantenidas en cultivo e infectadas con dos aislados diferentes del VPPA. El ADN degradado o pico hipoploide aparece a la izquierda del pico G_0/G_1 (fig. 62) y mide las células en apoptosis (Malorni *et al*, 1993). En la tabla 13 se expresan los porcentajes de células que se encontraron en cada fase.

Tabla 13.- Porcentaje de ADN en cada fase celular en células infectadas con diferentes aislados del virus.

FASES	CONTROL		VIRULENTO E70		ATENUADO E75	
	medio	ConA	medio	ConA	medio	ConA
S + G_2/M	7,47%	29,07%	9,19%	6,93%	7,81%	12,76%
G_0/G_1	61,01%	50,09%	60,68%	70,28%	81,28%	80,10%
sub G_0/G_1	27,38%	9,02%	23,93%	21,01%	6,29%	3,52%

Los resultados confirman en primer lugar el comportamiento celular observado en los experimentos de blastogénesis, es decir, en presencia de ambos virus no se obtuvo un incremento importante del porcentaje de células en síntesis y mitosis, como correspondería a una respuesta proliferativa, sino que se apreció un estancamiento en fase G_0/G_1 .

Pero además el hecho más sobresaliente de estos datos lo constituye la disminución de la fracción de células con ADN degradado que aparece en la infección con el aislado atenuado E75 con y sin mitógeno, lo que significa probablemente una disminución de la proporción de células muertas por apoptosis en los cultivos. Sin embargo con el aislado virulento aumentó la proporción de ADN degradado.

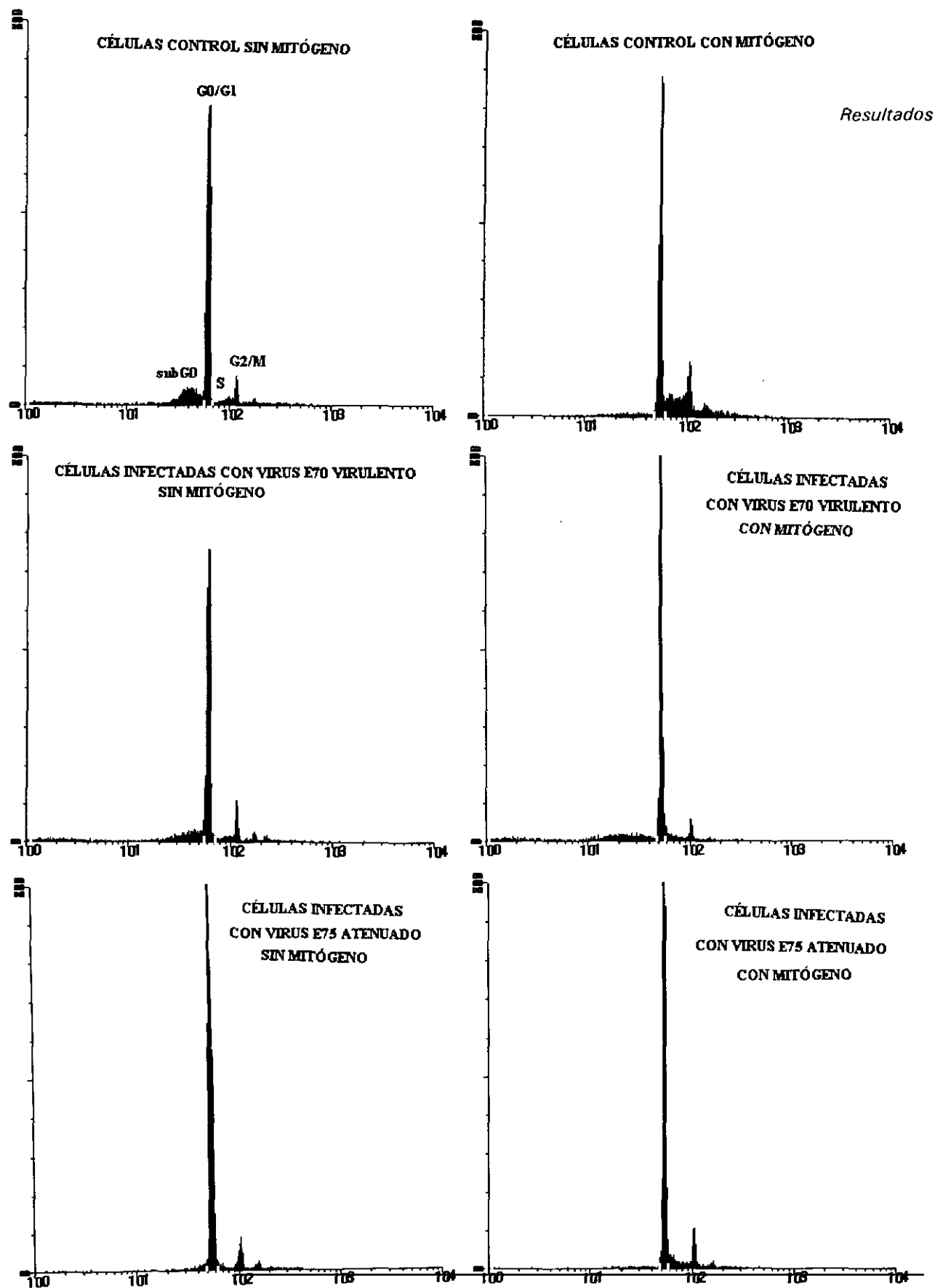


Fig. 62.- Ejemplos de histogramas del ciclo de ADN en células mononucleares infectadas con diferentes aislados y sin infectar. Variaciones en el ciclo del ADN de células infectadas con diferentes aislados.

3.- INTERFERENCIA DEL VPPA CON MECANISMOS REGULADORES DE LOS LINFOCITOS: APOPTOSIS O MUERTE CELULAR PROGRAMADA

El hecho observado durante la infección *in vitro* con el virus atenuado de que existiera una disminución llamativa del ADN degradado, llamó la atención sobre un posible efecto del virus sobre la muerte celular programada o apoptosis.

Entre las interacciones de diversos sistemas víricos con el sistema inmune, se ha descrito la interferencia de algunos agentes con este mecanismo regulador a nivel genético, presente en las células y que se conoce como muerte celular programada o apoptosis.

En el genoma del VPPA se ha descrito al menos un gen que presenta homología con genes implicados en la prevención de la apoptosis como el bcl-2 (Neilan *et al*, 1993). Para analizar el posible efecto del virus en estos sistemas reguladores de células del sistema inmune *in vitro* se utilizaron diversas técnicas complementarias entre sí.

3.A.- Criterios morfológicos.-

3.A.1.- Examen microscópico de las células.-

En el proceso de muerte celular programada se incluyen una serie de fenómenos consecutivos que finalizan en la destrucción y muerte celular sin exposición del material genético a los sistemas inmunitarios del organismo. Para conseguir este objetivo, dentro de las células se produce la activación de una endonucleasa que produce la fragmentación del ADN por sus puntos de unión internucleosomales, antes de que exista una permeabilización de la membrana.

Como consecuencia de este proceso se observa una condensación de la cromatina con marginalización periférica de la misma. Posteriormente se suceden los fenómenos de vacuolización citoplásmica (zeiosis), rotura de la membrana nuclear y formación de cuerpos apoptóticos, o restos nucleares rodeados de membrana celular que son fácilmente reconocibles con el microscopio óptico. Estos fragmentos serán posteriormente fagocitados por células del SMF (Swat *et al*, 1991; Dive *et al*, 1992).

Se realizaron extensiones por citocentrifugación de los cultivos para evaluar la morfología celular al microscopio óptico y valorar la existencia de células apoptóticas.

En los cultivos sin infectar, en presencia de mitógeno, observamos gran cantidad de linfocitos jóvenes y figuras de mitosis. Sin embargo, los cultivos infectados con virus virulento presentaban gran número de células muertas ("fantasmas celulares") y algunas células con condensación de cromatina y picnosis, sugestivas de células apoptóticas. Por su parte, las células infectadas con el aislado atenuado manifestaron características de baja activación, algunas figuras de apoptosis y escasas células muertas ("fantasmas celulares").

También se detectaron numerosas células en apoptosis en órganos de animales infectados con el aislado virulento, sobre todo zonas desvitalizadas de aspecto necrótico de ganglios linfáticos, con abundantes cuerpos apoptóticos y restos celulares (foto 22). De igual forma se observaron estas características morfológicas en bazo, estructuras linfoides del pulmón y en hígado (fotos 23, 24 y 25).

Por el contrario, los órganos linfáticos y las estructuras linfoides asociadas a sistemas respiratorio y gastrointestinal presentaban una llamativa hiperplasia en los animales infectados con el aislado atenuado, y carecían de imágenes sugestivas de apoptosis (fotos 26 y 27).

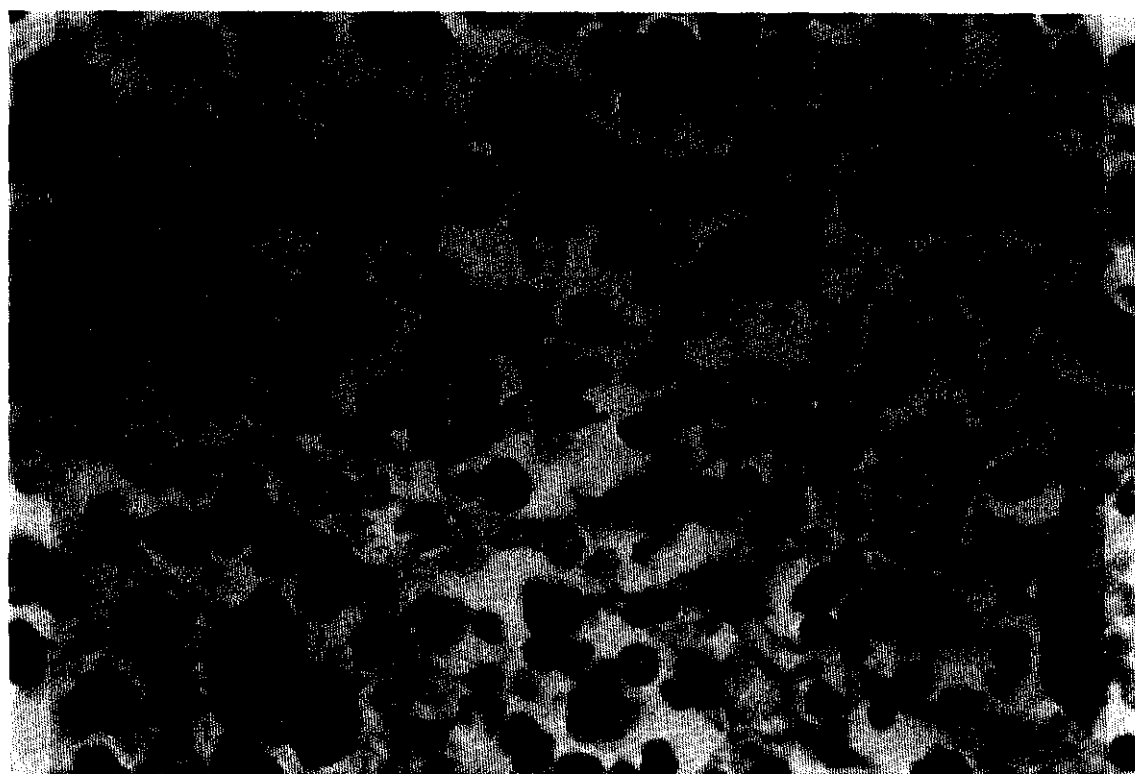


Foto 22.- Condensación de cromatina y formación de cuerpos apoptóticos. Ganglio. PPA aguda. H-E. 1000x.

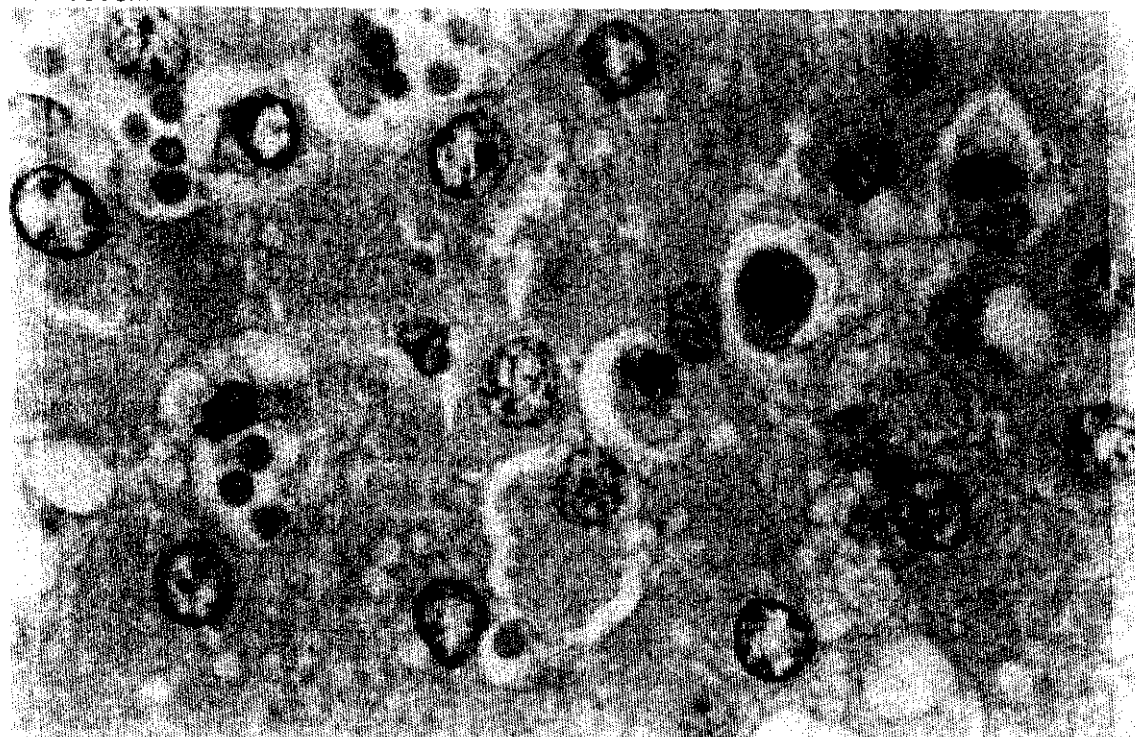


Foto 23.- Hígado en PPA aguda. Figuras de apoptosis. H-E- 1000x.

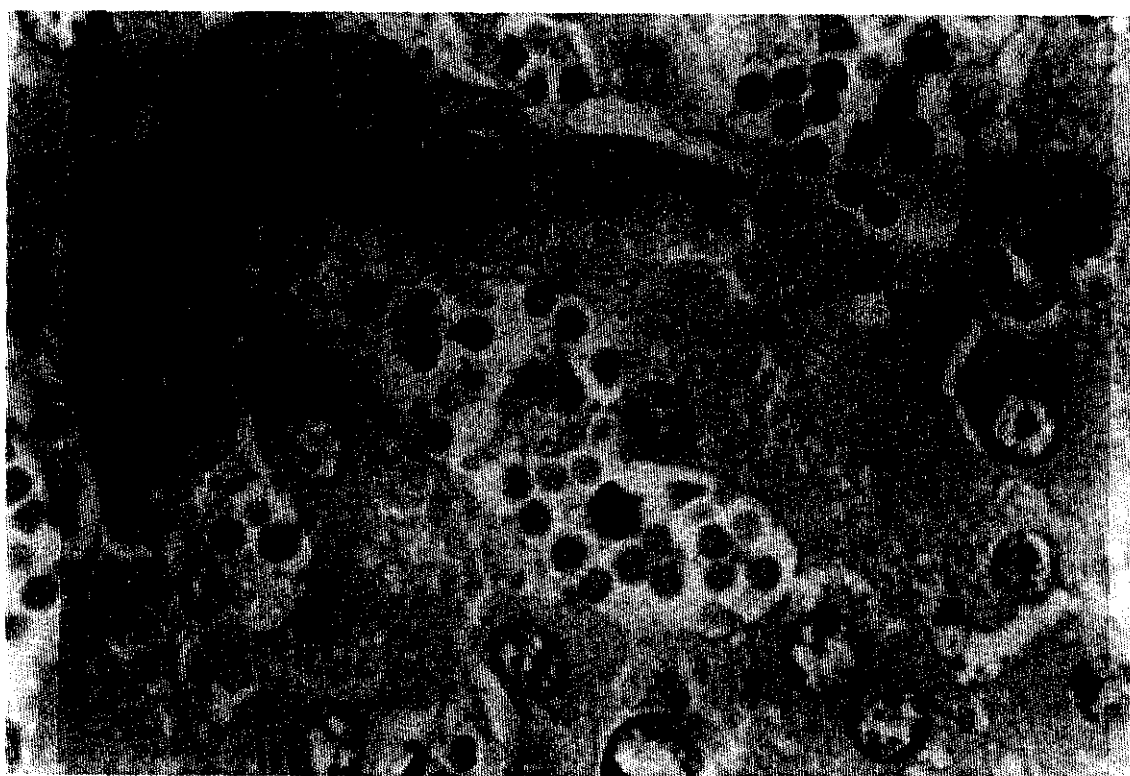


Foto 24.- Cuerpos apoptóticos en sinusoides hepáticos. H-E. 1000x.

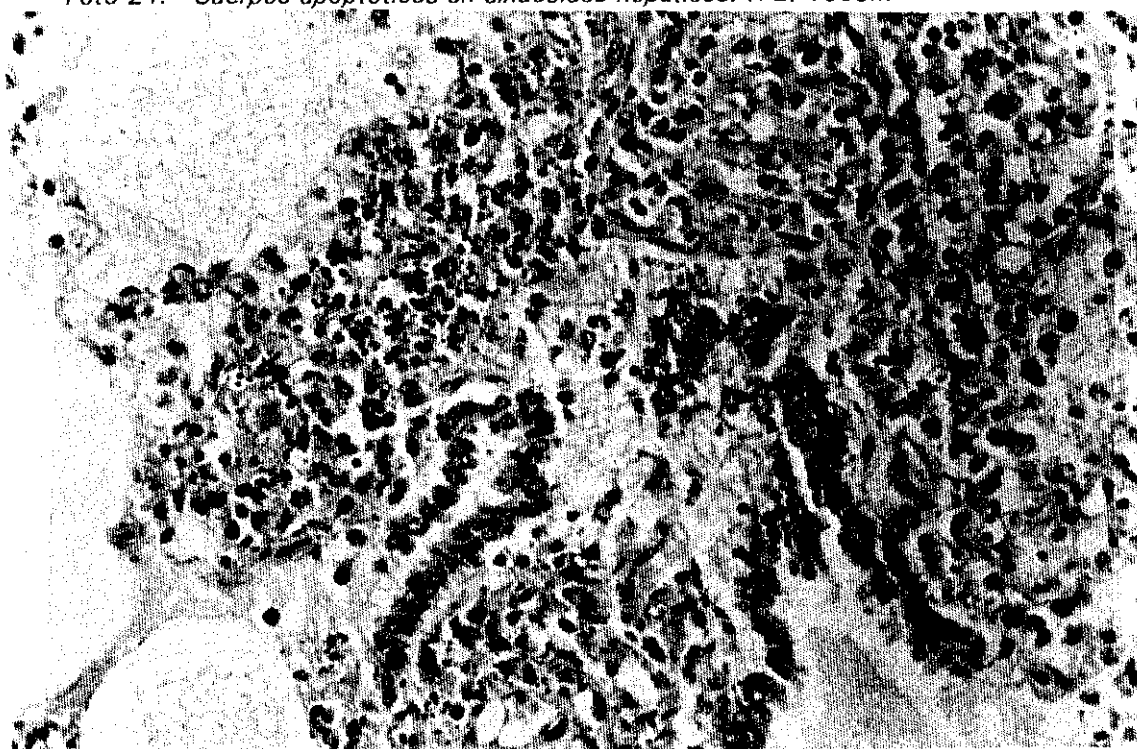


Foto 25.- Necrosis celular en formaciones linfoides del pulmón. Cuerpos apoptóticos. H-E. 250x.

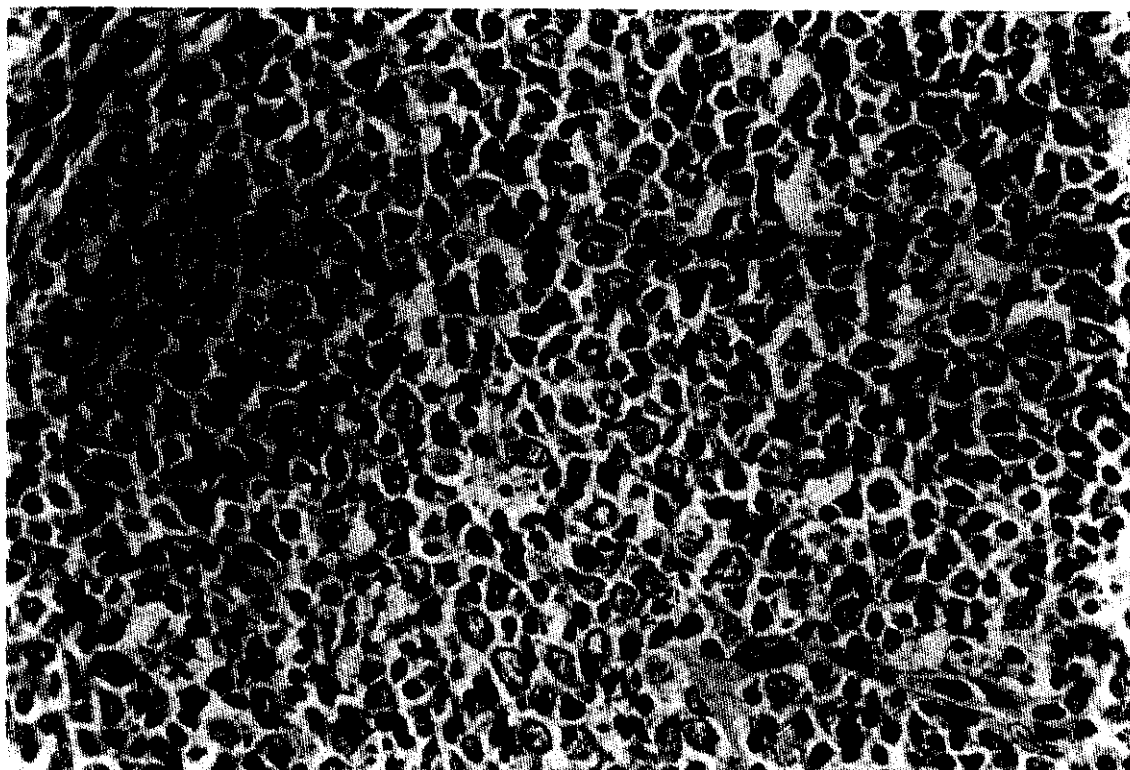


Foto 26.- Centro de un folículo linfoide con figuras de mitosis. PPA crónica. H-E. 400x.

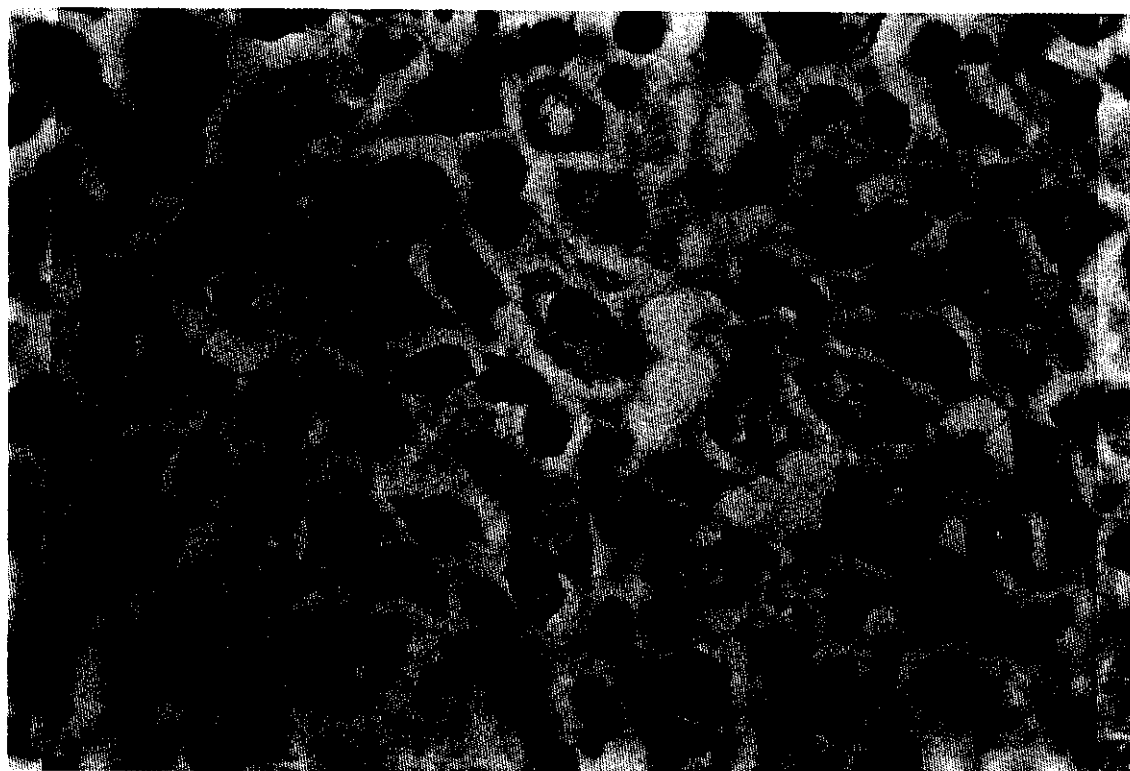


Foto 27.- Célula en mitosis en centro de un folículo. Forma crónica de PPA. H-E. 1000x.

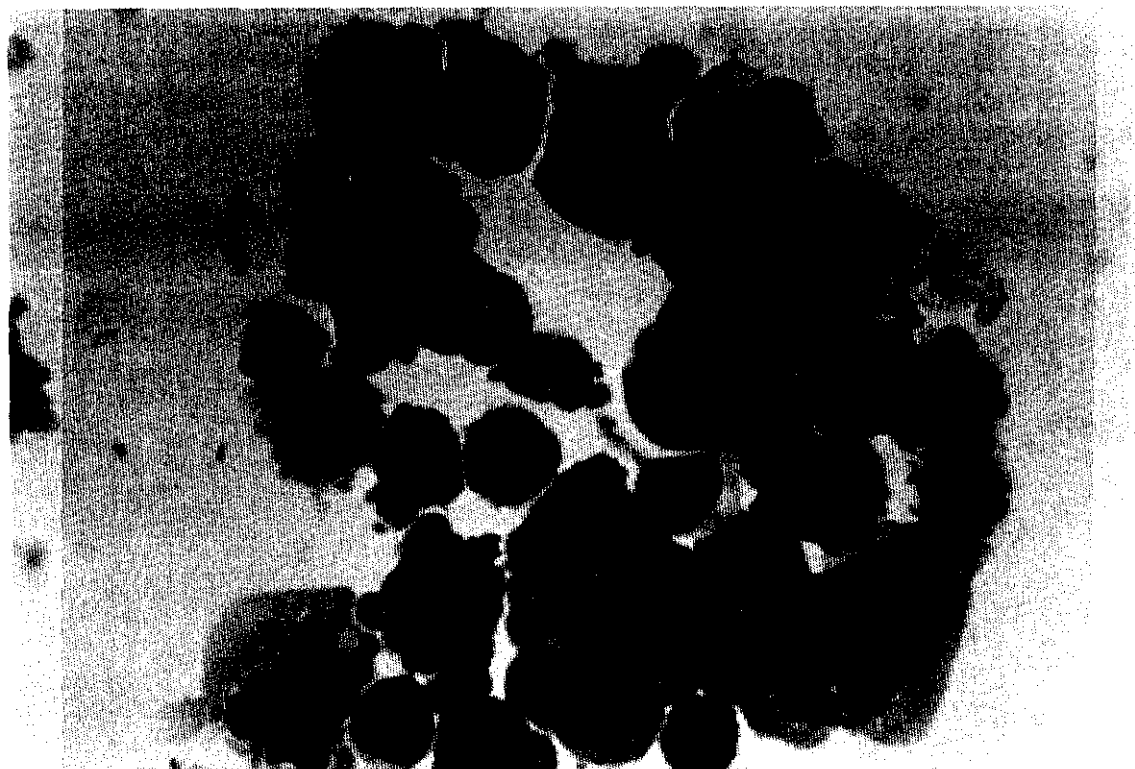


Foto 28.- Extensión de células infectadas con virus virulento. Formación de cuerpos apoptóticos. Giemsa. 1000x.

3.A.2.- Análisis de las células muertas por citometría de flujo.-

-Tamaño-complejidad.

Analizadas mediante citometría de flujo, las células en las primeras fases de apoptosis presentan una tendencia a disminuir de tamaño (FSC), y a aumentar de complejidad (SSC), debido a la vacuolización del citoplasma típica del proceso. Posteriormente, con la progresión del proceso y la destrucción celular, las células disminuyen en complejidad (Dive *et al*, 1992). La activación celular induce la aparición de células blásticas cuya característica principal es el aumento simultáneo del tamaño y complejidad celular.

Valoramos mediante citometría de flujo el tamaño y la complejidad de las células infectadas con los aislados E70 virulento y E75 atenuado, en presencia y ausencia del mitógeno ConA. Como resultado de este análisis hemos observado que las células infectadas con el aislado virulento disminuyen de tamaño y aumentan su complejidad, como corresponde a las primeras fases de apoptosis.

Cuando estudiamos estos parámetros en presencia del mitógeno ConA, en las células infectadas con el modelo E70 observamos un descenso muy marcado del tamaño y una disminución importante de la complejidad celular respecto a las células sin infectar mantenidas en las mismas condiciones de cultivo. Ambos representarían la progresión del proceso de apoptosis y la destrucción celular.

Por su parte, las células infectadas con el aislado E75 atenuado presentan un incremento tanto en tamaño como en complejidad respecto al cultivo sin infectar, lo que sugiere cierto grado de activación en todos los casos (fig. 63).

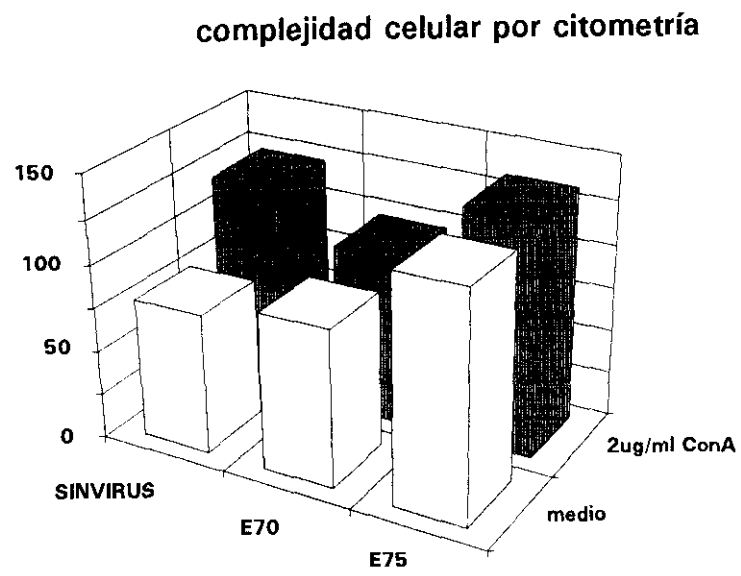
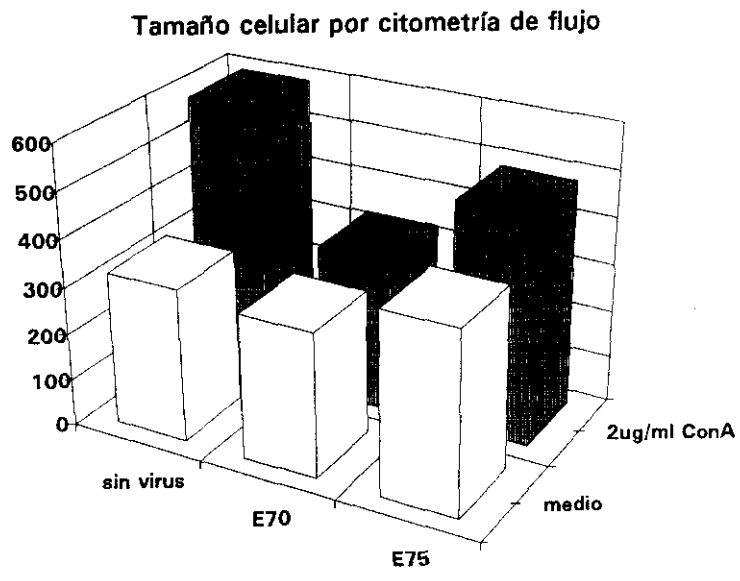


Fig. 63.- Variaciones en el tamaño y complejidad celular en células mononucleares tras la infección con diferentes aislados del VPPA. Los valores se expresan como el canal medio definido por citometría de flujo (gráficas a y b).

-Captación de yoduro de propidio.

Si bien esta técnica es utilizada sobre todo para separar elementos inviables

durante la caracterización de células por citometría de flujo, también resulta de utilidad para detectar células en las últimas fases de apoptosis o en fases de resolución (Dive *et al*, 1992; Razvi y Welsh, 1993; Fluckiger *et al*, 1994); es decir, cuando se afecta la permeabilidad de membrana, ya que el yoduro de propidio sólo se une al ADN de células con la membrana alterada.

Durante la valoración de la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio captado por las células, observamos un incremento del porcentaje de células positivas con el aislado virulento E70, así como de la intensidad media de fluorescencia presentada por las células que captaron el yoduro de propidio, aún más notable en los cultivos en presencia de ConA. Los incrementos se valoraron respecto a la células sin infectar y mantenidas simultáneamente en cultivo.

En los cultivos infectados con el aislado atenuado E75CV₁-4 en presencia del mitógeno, observamos una disminución de la proporción de células positivas con yoduro de propidio además de disminuir la fluorescencia media manifestada por éstas. Estos resultados podrían indicar la disminución del número de células en las últimas fases de apoptosis (figs. 64 y 65).

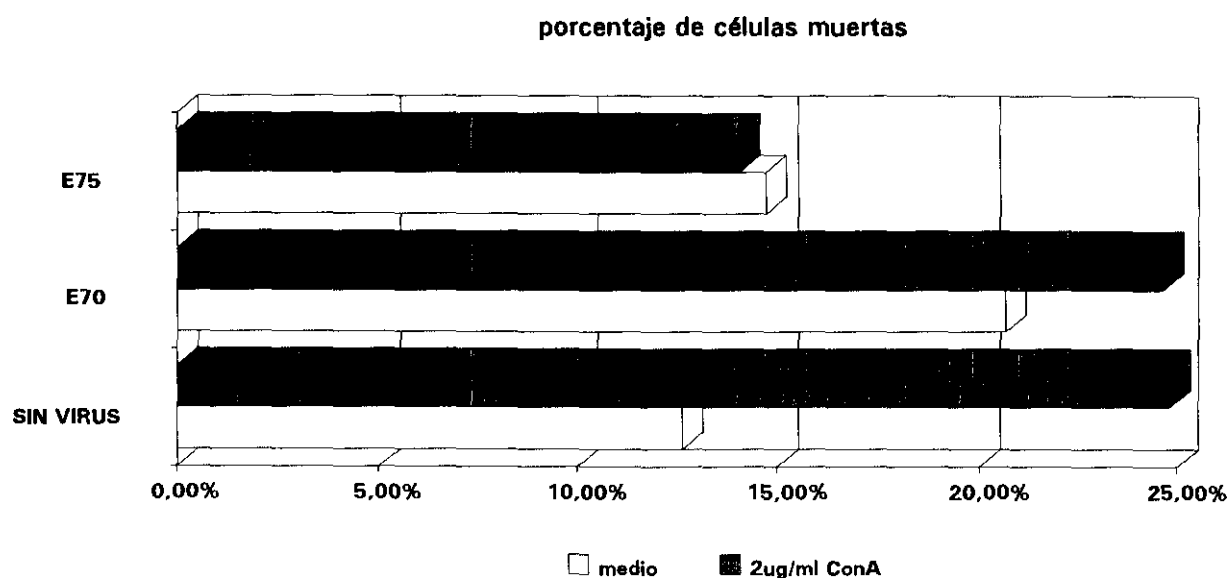


Fig. 64.- Porcentaje de células mononucleares que captan yoduro de propidio tras su infección en cultivo con diferentes aislados del VPPA.

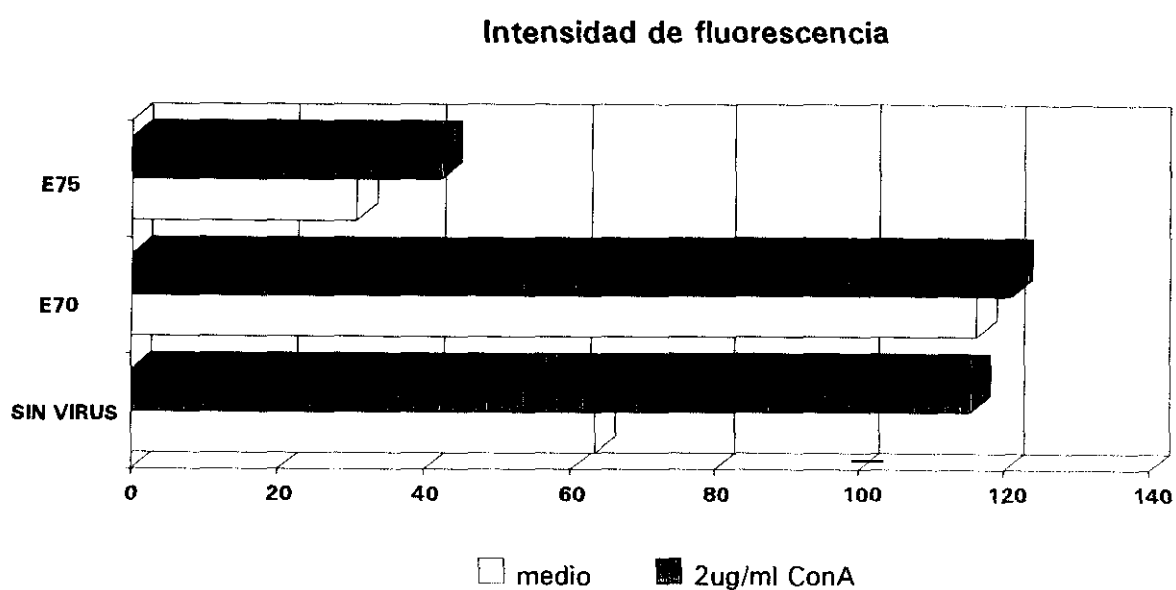


Fig. 65.- Intensidad media de fluorescencia tras el marcaje con yoduro de propidio de células mononucleares infectadas con diferentes aislados del VPPA.

3.B.- Criterios moleculares de muerte celular programada.-

3.B.1.- Fragmentación del ADN en geles de agarosa.-

Las técnicas anteriores proporcionaron resultados indicativos coincidentes en todos los casos, pero para confirmar la existencia de muerte celular debido al fenómeno de apoptosis fue necesario comprobar la fragmentación del ADN

mediante electroforesis en geles de agarosa.

Como ya hemos mencionado, durante la apoptosis se activa una endonucleasa que produce una fragmentación del ADN nuclear en sus regiones más accesibles: los fragmentos internucleosomales.

Así se generan por fraccionamiento del ADN múltiples oligonucleosomas de unos 180 pares de base (o sus múltiplos), que proporciona una imagen de "escalera" (laddering) en el gel de agarosa (fig. 66).

En nuestras condiciones de cultivo, y durante los períodos de tiempo analizados, este fenómeno fue observado igualmente en cultivos sin infectar e infectados con diferentes aislados, ya que sólo en períodos muy cortos desaparece la apoptosis espontánea de los linfocitos en cultivo.

Aunque con este sistema se establece con certeza la existencia de apoptosis, no fue posible cuantificar las diferencias entre unos y otros cultivos.

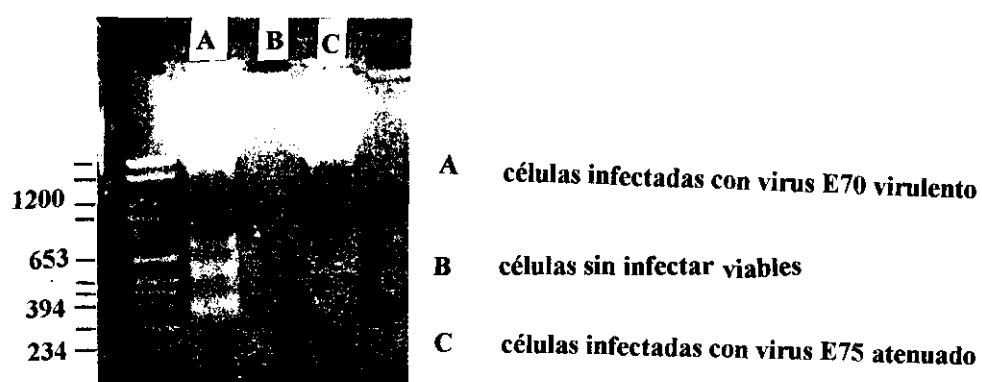


Fig. 66.- Ejemplos de electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído de diferentes cultivos infectados con el VPPA.

3.B.2.- Cuantificación de la fracción de histonas asociadas a los fragmentos de ADN generadas en el proceso de apoptosis.-

La apoptosis existente en los cultivos se cuantificó midiendo la fracción de proteínas histónicas mediante una prueba de enzimoimmunoensayo que utiliza anticuerpos anti-histonas en un sistema de "sandwich". En los fragmentos oligonucleosomales generados durante la apoptosis, el ADN está densamente empaquetado con las histonas H2A, H2B, H3 y H4, que se unirán al anticuerpo adherido a la placa.

Utilizando esta técnica de ELISA anti-histonas se cuantificaron las diferencias existentes en la producción de apoptosis en cultivos celulares por diferentes aislados víricos, a varios tiempos postinfección comparados con cultivos celulares sin infectar, a una multiplicidad de infección de 1.

En células viables extraídas y procesadas el mismo día, sin ser mantenidas en cultivo, obtuvimos una disminución de la apoptosis del 80,27% respecto a células mantenidas en cultivo durante 24 horas. Por lo tanto, siempre se utilizó un control de células sin infectar cultivadas los mismos tiempos que los cultivos problema como referencia de valores basales de apoptosis.

Los cultivos celulares se infectaron con una $MI = 1$ con diferentes aislados del virus de la PPA. Algunos aislados virulentos (E70 y E75) produjeron un leve incremento de la apoptosis basal observada en cultivos sin infectar (fig. 14). Por otra parte, ciertos aislados atenuados o adaptados a líneas celulares (E70, E75, BA71, 608) desarrollaron una inhibición de la apoptosis desarrollada en cultivos sin infectar (fig. 67).

Todos los aislados se probaron a diferentes horas postinfección, de forma que el incremento del tiempo de infección acentuaba los efectos desarrollados, tanto en incremento como en disminución de la apoptosis basal.

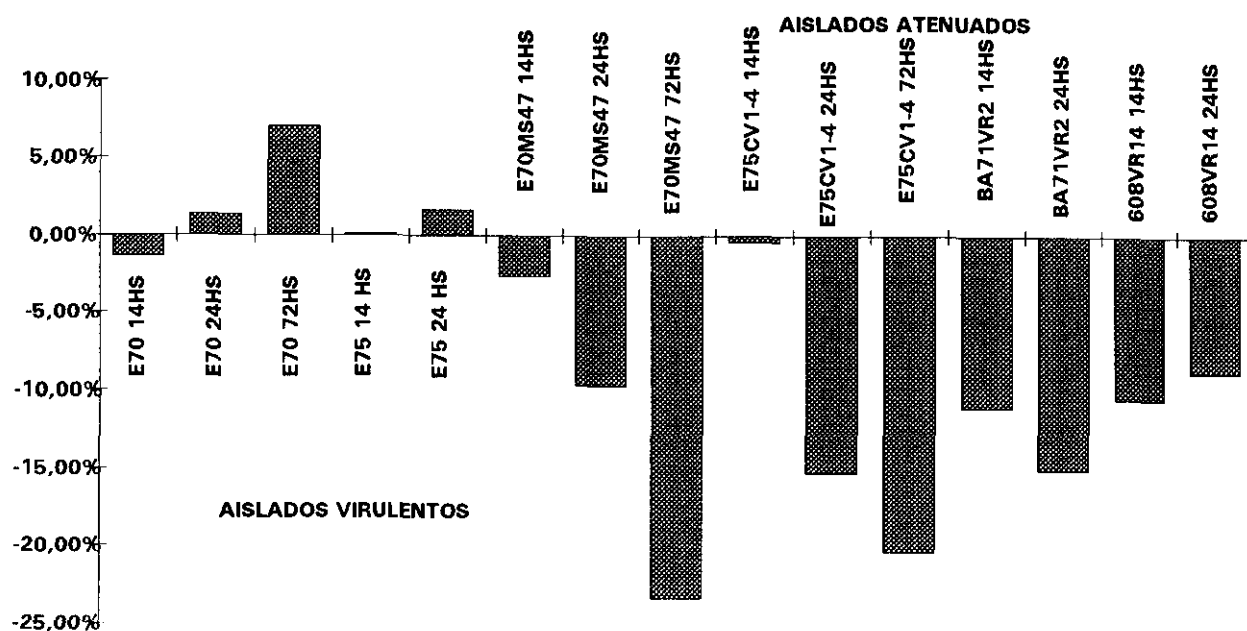


Fig. 67.- Variaciones en el nivel de apoptosis en cultivos celulares infectados con diversos aislados del VPPA. Las modificaciones se consideran respecto a células sin infectar mantenidas el mismo tiempo en cultivo.

Distintos estímulos de la blastogénesis *in vitro* resultaron ser inhibidores de la apoptosis en los cultivos sin infectar: el mitógeno ConA (5 %) y la citoquina IL-2, mientras que la presencia de ambas sustancias en el cultivo produjo unos efectos

más moderados. También estudiamos su efecto sobre cultivos infectados.

El efecto combinado del virus con el mitógeno ConA, inhibió ligeramente (4,63%↓) la ruta de apoptosis de las células infectadas (con el virus E70 virulento, durante 72 horas). Un efecto similar se obtuvo cuando se utilizaron inhibidores de la apoptosis como la ciclosporina A o la IL-2, así como cuando utilizamos conjuntamente el mitógeno concanavalina A y la ciclosporina A sobre un cultivo infectado.

Sin embargo la combinación del mitógeno ConA y la IL-2, en células infectadas con el virus E70 virulento, no desarrolló prácticamente ninguna inhibición sobre la apoptosis basal. El efecto combinado de dos inhibidores de las vías de apoptosis como la IL-2 y la CsA produjo la máxima disminución de la apoptosis observada en este sistema, de un 10,44% sobre los cultivos sin infectar (fig. 68).

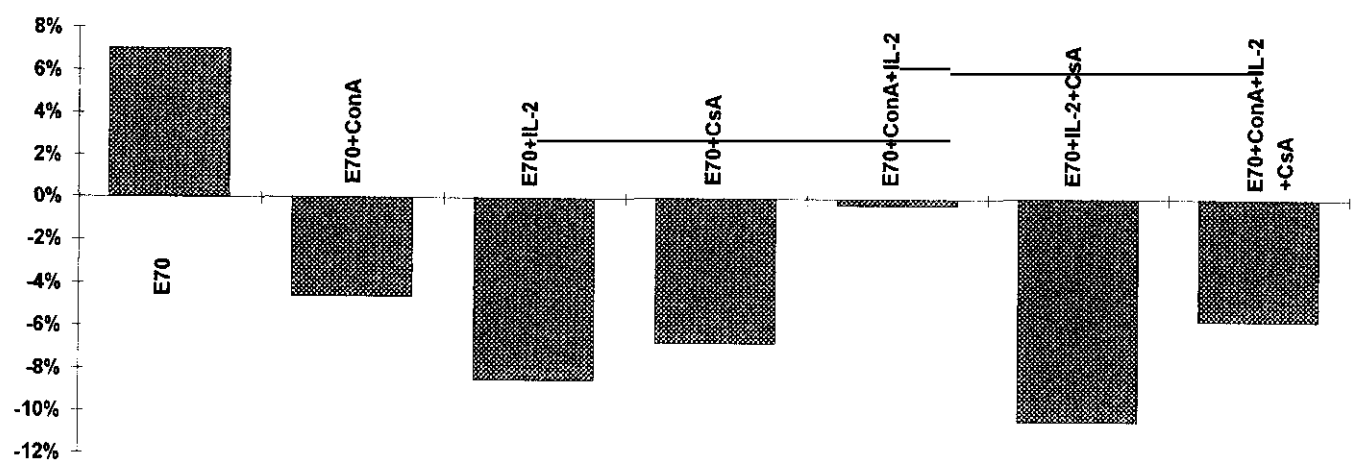


Fig. 68.- Variaciones en el nivel de apoptosis en cultivos infectados con el aislado virulento E70 tras diversos la aplicación de diferentes estímulos en el medio de cultivo.

Cuando comprobamos el efecto de diversos estímulos sobre células infectadas con un aislado atenuado (E75CV₁-4) observamos que se redujo la apoptosis respecto al cultivo sin infectar, y que la máxima inhibición se manifestó con el virus solo (20,38%↓). La adición del mitógeno ConA (14,89%↓) o la citoquina IL-2 (9,25%↓) al medio por separado o en combinación (11,64%↓), produjeron una menor inhibición de la apoptosis que en cultivos mantenidos solo con el virus. Cuando además se añadió CsA junto con el mitógeno y la citoquina se recuperaron las condiciones basales, mientras que utilizando sólo la CsA con IL-2 de nuevo se observó una reducción de la apoptosis (fig. 69).

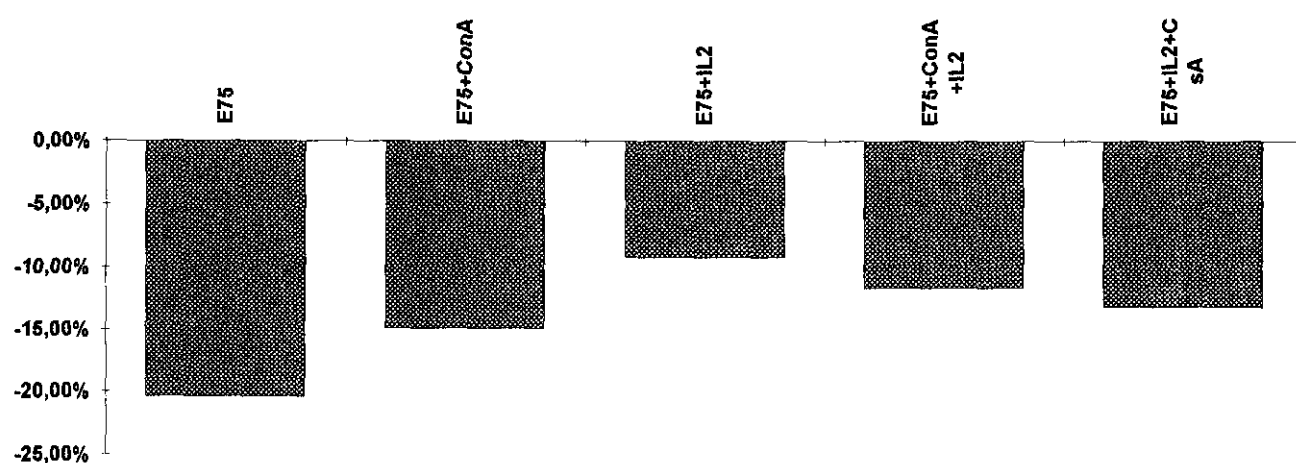


Fig. 69.- Variaciones sobre la apoptosis inducida por el aislado E75 atenuado tras la inclusión en el medio de diferentes compuestos.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y CINÉTICA DE LA INFECCIÓN

La inoculación de un aislado atenuado permitió observar diversas evoluciones clínicas dentro del grupo de animales de experimentación utilizando la vía oral, representativo de los distintos cuadros clínicos que pueden encontrarse en la infección natural.

Aunque en bajo porcentaje (22%), algunos animales presentaron un curso agudo de la enfermedad, indistinguible del cuadro característico de la infección con una aislado virulento del VPPA que termina con la muerte de los animales en los días de máxima viremia. La mayoría, sin embargo, presentó un cuadro clínico subagudo en el que la viremia se prolonga disminuyendo algo los títulos de virus, y en el curso del cual puede ocurrir en cualquier momento un agravamiento de los síntomas y muerte.

El perfil temporal de la viremia en las tres primeras semanas fue típico de la infección en cada caso agudo o subagudo (Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1983; Hamdy y Dardiri, 1984; Knudsen y Genovesi, 1987; Alcaraz *et al*, 1992). Sólo una pequeña proporción de animales presentaron un curso crónico y superaron la sexta semana postinfección, siendo virémicos. Estos animales tardaron tiempos variables en aclarar el virus de la sangre, prolongando la viremia hasta los 50 o 90 días.

Incluso un grupo de animales presentaron una forma de PPA inaparente en la que los animales desarrollaron anticuerpos frente al virus, pero no se llegó a detectar viremia, ni otra sintomatología aparte de fiebre. Con esta evolución cursan los animales sometidos a este modelo experimental que en los experimentos de

protección serán posteriormente sometidos a contraprueba con virus virulentos homólogos y heterólogos. Hoy en día se ha conseguido obtener animales resistentes en ambos casos (Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1983; Escribano, comunicación personal)

Las semejanzas de la infección natural con este modelo experimental con presentación de diversos cuadros clínicos que aparecen en la naturaleza hace que sea el modelo de elección para un estudio de patogenia de la PPA. De hecho, cuando el virus entró por primera vez en la Península Ibérica producía con mayor frecuencia cuadros agudos y sobreagudos, mientras que posteriormente fueron apareciendo en mayor número formas crónicas e inaparentes (Sánchez-Botija, 1982).

La mortalidad y la morbilidad desarrollada por la enfermedad depende del aislado utilizado. En el presente estudio, la mortalidad debida al aislado virulento E70 fue del 100% entre los días 7 y 8 postinoculación utilizando la vía intramuscular. Este índice de mortalidad es similar al observado previamente en el mismo modelo experimental (Slauson y Sánchez-Vizcaíno, 1981; Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1983; Alcaraz *et al*, 1992; Fernández *et al*, 1992). Los aislados virulentos (E70, L60, Malawi'83) provocan la muerte de casi la totalidad de los animales durante los primeros 10 días de enfermedad (Montgomery, 1921; Moulton y Coggins, 1968; Konno *et al*, 1970; Anderson *et al*, 1987; Villeda *et al*, 1993).

Los títulos de virus alcanzados en el modelo virulento E70 no fueron tan elevados como los alcanzados en el modelo atenuado, lo cual nos indica que entre diferentes cepas del virus no existe correlación entre los títulos de virus alcanzados en sangre periférica con el desarrollo de la enfermedad, aunque dentro del mismo modelo sí parece evidente que los mayores títulos de virus se desarrollan en los animales con síntomas más graves y mayor mortalidad.

1.a.- Sintomatología.-

La sintomatología general desarrollada durante la infección con el virus E75 atenuado y E70 virulento fue característica de peste porcina africana (Montgomery, 1921; Moulton y Coggins, 1968; Coggins *et al*, 1968; Moulton *et al*, 1975; Hamdy y Dardiri, 1984; Genovesi *et al*, 1988; Villeda *et al*, 1993). Debido a las alteraciones de la coagulación existentes, los procesos de sangría contribuyeron de forma notable a acelerar el desarrollo fatal de la infección, principalmente en los animales que padecieron sus formas más graves (Edwards *et al*, 1984). Esto quedó demostrado por la aparición de severas hemorragias externas e internas, características de un proceso de coagulación intravascular diseminada donde coexisten los fenómenos trombóticos y hemorrágicos que forman el cuadro agudo de la enfermedad (Edwards *et al*, 1984; 1985; 1985a; Naser *et al*, 1986; Anderson *et al*, 1987; Villeda *et al*, 1993, 1993a). Otros síntomas que se desarrollan en los cuadros subagudos son la sintomatología respiratoria con intensa disnea, emaciación, debilidad e inapetencia. Los casos crónicos desarrollan enfermedad pulmonar, artritis y dermatosis crónica.

Tanto en los cerdos infectados con el aislado atenuado como con el virulento, la presentación de hipertermias coincidió con la presencia detectable de virus en sangre periférica. La temperatura media alcanzada fue mayor durante los días de máxima viremia con el aislado E70 virulento, coincidiendo con los datos publicados (Hamdy y Dardiri, 1984; Knudsen y Genovesi, 1987; Genovesi *et al*, 1988; Villeda *et al*, 1993).

Antes de comenzar los experimentos con inmunosupresión se comprobó que el fármaco no presentara acciones directas frente al virus y contrariamente a lo observado para otros virus *in vitro*, el virus de la PPA no fue inhibido en su capacidad replicativa por la presencia de ciclosporina A en el medio de cultivo a las dosis probadas (Valhne *et al*, 1992; Clarissa y Keller, 1994).

El tratamiento inmunosupresor *in vivo* pareció incidir de forma negativa sobre el curso clínico de la infección. En los cerdos infectados con el aislado atenuado

E75 se incrementó el nivel de mortalidad espontánea 57% (4/7), como ocurre en otros modelos víricos (Hiraoka *et al*, 1992). El aumento de la mortalidad se debió en parte a la aparición de infecciones oportunistas en los animales, a pesar de la profilaxis antibiótica realizada. También hemos observado durante nuestros desarrollos experimentales una mayor tendencia a la presentación de alteraciones de tipo hemorrágico. Villeda *et al*, (1993a) señalan el desarrollo de una coagulopatía de consumo como precursora del "shock" que finaliza con la muerte de los animales.

La acción de la CsA sobre los vasos, bien de forma directa alterando mecanismos secretores de las células endoteliales (Leszczynski *et al*, 1993), o bien de forma indirecta por su acción sobre células del sistema inmune (Reidy, 1991; Dogan *et al*, 1993), podría favorecer el mantenimiento y la progresión de las alteraciones del sistema de coagulación desarrolladas durante la PPA (Edwards *et al*, 1985; Anderson *et al*, 1987; Villeda *et al*, 1993, 1993a). Inclusive tras alterar la respuesta inmune normal, podría existir una capacidad replicativa incrementada del virus lo cual también explicaría la mayor tendencia a presentar alteraciones de la coagulación (Stitz *et al*, 1989; 1991; Meers *et al*, 1993). Así pues, en estos modelos experimentales, parece tener un papel fundamental la interferencia con los mecanismos de defensa inmunitaria, al promover una menor protección frente al virus (Kastrukoff *et al*, 1993).

En el caso de la inmunosupresión y posterior inoculación del virus virulento, no pudimos apreciar grandes diferencias durante el curso clínico, pues su rápido desarrollo impidió la percepción de procesos que pudieron quedar enmascarados por la progresión de la enfermedad.

En el modelo experimental E75 atenuado, los cerdos tratados con ciclosporina A presentaron fenómenos hipertérmicos más prolongados que sus homólogos no inmunosuprimidos, con diferencias significativas en los días 14 y 15. A la prolongación de la hipertermia podría contribuir una mayor facilidad del virus para mantenerse en el organismo, ante la alteración del sistema inmunitario de los

hospedadores (Stitz *et al*, 1991; Meers *et al*, 1993). En apoyo de este supuesto, hemos encontrado que las viremias en los cerdos inmunosuprimidos durante la infección (días 6 y 12 pi), fueron generalmente mayores a las presentadas por los animales no tratados con CsA en momentos finales del desarrollo experimental.

Una mayor duración de la viremia en animales tratados con CsA podría contribuir al desarrollo de una hipertermia más prolongada y a la aparición de síntomas más evidentes. En otros sistemas víricos como el FIV, el HSV-1, el virus Cosackie B3 o el virus de la enfermedad de Borna se ha descrito un aclaramiento menor del virus tras la inmunosupresión y una mayor difusión de las partículas víricas (Stitz *et al*, 1991; Hiraoka *et al*, 1992; Kastrukoff *et al*, 1993; Meers *et al*, 1993).

Es un hecho conocido la mayor susceptibilidad de los huéspedes inmunosuprimidos a las infecciones víricas, que en tales condiciones se presentan como enfermedades diseminadas con mayor gravedad de los síntomas y mayor letalidad.

La distribución tisular del virus de la PPA, estudiada mediante técnicas de inmunohistoquímica en tejidos de cerdos infectados con el virus virulento E70, fue similar en los cerdos tratados con CsA y los no tratados con este fármaco. Una mayor diseminación del virus en animales inmunosuprimidos durante la infección ha sido descrita en otros modelos víricos (Stitz *et al*, 1991). Sin embargo este fenómeno no se ha producido en el caso del virus de la peste porcina africana.

Encontramos algunas diferencias con estudios inmunohistoquímicos previos realizados con este aislado. Así en nuestro estudio, las células pulmonares que presentaron reactividad con más frecuencia fueron tanto macrófagos intersticiales como intracapilares, a diferencia de dichos trabajos anteriores en los que fueron los monocitos circulantes las células más frecuentemente infectadas. Por otro lado, no pudimos encontrar positividad clara en hepatocitos, aunque no se descarta que ésta pudiera existir como han señalado estos autores (Fernández *et al*, 1992, 1992a, 1992b).

En la zona marginal de la pulpa blanca del bazo pudimos observar la presencia de algunas células con antígeno vírico. Aunque en algunos trabajos no se menciona la existencia de antígeno vírico en pulpa blanca (Fernández *et al*, 1992; 1992b), otros autores sí han descrito inmunotinción positiva en este compartimento (González-Juarrero *et al*, 1992).

Estas diferencias presentadas con trabajos previos bien pudieran deberse a las modificaciones introducidas en nuestra técnica inmunohistoquímica, que aumentan su sensibilidad por el tratamiento previo del tejido (microondas) y por el uso de anticuerpo biotinilado. También pudieron influir las variaciones intrínsecas de cada uno de los animales.

A nuestro modo de ver, es aún más llamativo el hecho de que la mayor reactividad se encontrase en tonsilas de animales infectados, a pesar de haber sido inoculados vía intramuscular. No se han encontrado referencias sobre la inmunotinción frente al virus de la PPA de este tejido. Según nuestros resultados el virus mantiene su tropismo por los órganos diana típico de las infecciones naturales por la vía oronasal, confirmando su alta capacidad de diseminación orgánica. También nos parece interesante el hecho de la existencia de células infectadas en capas profundas de la piel, ya que es frecuente la aparición de lesiones cutáneas en peste porcina africana.

En los bazos de animales infectados con virus virulento de la PPA ha sido descrita una deplección linfoide y necrosis de pulpa roja primero y posteriormente de pulpa blanca (Moulton y Coggins, 1968; González-Juarrero *et al*, 1992). Por contra, en animales infectados con virus atenuado sólo se refiere la existencia de frecuentes figuras mitóticas en los tejidos linfoides (González-Juarrero *et al*, 1992). Sin embargo, en nuestro trabajo hemos observado fenómenos similares a los mencionados en los órganos de los animales infectados con el aislado virulento y

atenuado, extendiendo este aspecto microscópico a todos los tejidos linfoides como ganglios, tejido linfoide asociado a bronquiolos, tonsilas...

Tras el análisis de los resultados hematológicos durante la infección con el aislado E75CV₁-4 concluimos que se produce una leucopenia transitoria, (hasta un 48% menor), que coincide con los momentos de viremia alta y de elevación de la temperatura en los animales. Esta leucopenia fue mucho más manifiesta en los animales que presentaron un desarrollo clínico más agudo de la enfermedad, con cifras inferiores a 6000 células/mm³. La caída del recuento total de glóbulos blancos ha sido descrita para este y otros aislados del VPPA donde se señala una disminución de hasta un 60% entre los días 4-9 postinoculación y más marcada en animales jóvenes (Sánchez-Vizcaíno *et al*, 1981; DeTray y Scott, 1957) .

Por el contrario, Knudsen y Genovesi (1987) y Genovesi *et al*, (1988) no observaron ninguna disminución significativa del recuento global de leucocitos tras la inoculación de un aislado atenuado, diferencias que pueden ser debidas a la diferente pauta de valoración temporal o a la utilización de aislados con distintas características patogénicas. Sin embargo, sí se mencionó la existencia de una linfopenia transitoria en el día 4.

La leucopenia que aparece durante la progresión de la PPA, es de menor duración que la presentada en otros procesos víricos porcinos como en la Peste Porcina Clásica (Susa *et al*, 1992). En esta enfermedad la leucopenia se atribuye a una destrucción de centros germinales en los tejidos linfoides, destrucción que por otra parte también se observa en algunas fases de la PPA (Moulton y Coggins, 1968).

La disminución del número de leucocitos se acompañaba de un incremento de la proporción total de neutrófilos, con clara desviación a la izquierda y una linfopenia relativa (44,28% menor) en el conteo diferencial que es típico de la PPA (De Tray y Scott, 1957). Estas alteraciones en la población periférica de linfocitos

pudieran ser debidas a una retención de linfocitos en los órganos de mayor respuesta antigénica (Binns y Pabst, 1994) o a una destrucción de las células linfoides en órganos del sistema inmune (Susa *et al*, 1992).

En los animales inmunosuprimidos existió una diferencia significativa inicial en el recuento de leucocitos con los cerdos no inmunosuprimidos. También se observó una fase leucopenica aunque de menor cuantía (32,29% ↓) y retrasada en el tiempo hasta la segunda semana postinoculación. En este caso tampoco coincidió con una neutrofilia. Una menor destrucción celular, por la interferencia de la inmunosupresión con procesos inmunopatológicos, o una menor quimiotaxis tras alteraciones en las citoquinas podrían responder a estas diferencias. Como veremos más adelante, también otros cambios desarrollados en poblaciones de la respuesta inmune se presentaron retrasados durante la progresión de la infección respecto a los animales inmunocompetentes.

En el caso de nuestro modelo virulento E70, hemos observado la existencia de una disminución temprana (día 2 postinfección) del número total de leucocitos y posteriormente un destacado incremento en el día 7 (144,97% ↑) previo a la muerte de los animales. Esta leucocitosis estuvo acompañada de un incremento de la proporción de linfocitos y una elevación de 4,26 veces la cifra base en el porcentaje de monocitos. Estos hechos no fueron observados con otros aislados virulentos (DeTray y Scott, 1957; Mebus y Dardiri, 1980).

Cuando los cerdos infectados con este mismo aislado fueron inmunosuprimidos, el recuento total de leucocitos aumentó en el día 7, pero en menor cuantía. Parece, pues, que la respuesta inmunológica exacerbada en el primer caso, puede ser frenada por el tratamiento inmunosupresor.

La producción de anticuerpos específicos frente al virus en los animales

infectados con el modelo atenuado fue equivalente a la obtenida en otros desarrollos experimentales, con un incremento logarítmico desde el final de la primera semana postinfección hasta su estabilización en fases crónicas (De Tray, 1957; Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1983; Schlafer *et al*, 1984; Knudsen y Genovesi, 1987; Hortigüela *et al*, 1993). Se volvió a comprobar la existencia simultánea de viremia y un título importante de anticuerpos en sangre, como ya se había descrito anteriormente (De Tray, 1957; DeBoer *et al*, 1972; Sánchez-Vizcaíno *et al*, 1981; Knudsen y Genovesi, 1987).

Estos anticuerpos presentaron capacidad neutralizante *in vitro*, a pesar de que existiera una mínima fracción no neutralizada. Este fenómeno ya ha sido descrito para otros aislados víricos (Ruiz-Gonzalvo *et al*, 1986; Zsak *et al*, 1993).

Como era de esperar debido a la acción del fármaco inmunosupresor, en los animales tratados se desarrolló una menor producción de anticuerpos específicos, aunque la inhibición de los mismos no fue total (Klaus, 1988; Roost *et al*, 1990). Esta menor producción de anticuerpos podría favorecer la prolongación de la fase virémica que se insinúa en los animales inmunosuprimidos, pues otros autores han demostrado la importancia de los anticuerpos en la reducción de la viremia en PPA (Norley y Wardley, 1983; Wardley *et al*, 1985; Wardley *et al*, 1987). Además, los anticuerpos producidos en los animales tratados con CsA presentaron una menor capacidad neutralizante, lo cual indica que las alteraciones inmunológicas provocadas por la CsA pueden influir sobre la afinidad de los anticuerpos producidos (Klaus *et al*, 1988; Wicker *et al*, 1990).

En otros sistemas víricos como la enfermedad aleutiana de los visones, los anticuerpos frente al virus pueden limitar su diseminación a la vez que pueden provocar procesos inmunopatológicos, y actuando en combinación con el antígeno vírico, y producir una enfermedad de desarrollo agudo o simplemente actuar favoreciendo el desarrollo de la infección (Kanno *et al*, 1993; Alexandersen *et al*, 1994).

La producción de inmunopatologías en Peste Porcina Africana debida a la presencia de anticuerpos o inmunocomplejos ha sido descrita en diversos trabajos implicándose en el desarrollo de diferentes alteraciones orgánicas como glomerulonefritis o alteraciones del sistema plaquetario (Hess y Pan, 1977; Edwards *et al*, 1985a; Martín-Fdez. *et al*, 1991)

2.- ANTÍGENOS SUPERFICIALES Y CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

La proteína p30 es una proteína vírica temprana expresada en la membrana de las células infectadas (Alcaraz *et al*, 1989; Afonso *et al*, 1992; Alcaraz *et al*, 1992). La detección por citometría de flujo de esta proteína ha permitido caracterizar el compartimento celular infectado en sangre periférica.

Combinando anticuerpos frente a la p30 con la utilización de marcadores frente a antígenos característicos de diferentes poblaciones celulares, como el SWC₃ nos permitió conocer cuales eran las poblaciones más implicadas en la replicación del virus en sangre periférica y la proporción de las mismas (Pescovitz *et al*, 1984) .

La proteína de membrana p30 se expresaba principalmente en células del sistema monocitario/macrofágico y en un pequeño porcentaje de granulocitos. Esto permitió la cuantificación de las fluctuaciones en los porcentajes de células infectadas a lo largo de la viremia, que variaron entre un 2-20% de la fracción de células susceptibles. Las subpoblaciones celulares que expresaban p30 fueron las mismas con ambos aislados utilizados. Sin embargo los porcentajes eran mayores en los animales que presentaron peor evolución clínica. Además, con el aislado atenuado se presentó un retraso de los valores máximos tanto de viremia como del porcentaje de expresión de p30.

Este anticuerpo constituye así un buen marcador cuantitativo de la evolución de la infección *in vivo*. Un estudio comparativo con los títulos de virus en sangre periférica demostró una correlación positiva con la expresión de p30 en los

animales infectados hasta alcanzarse los títulos máximos de viremia.

Por el contrario, mientras que a partir del día 10 postinfección los porcentajes de p30 disminuyeron rápidamente, los títulos de virus en sangre permanecieron elevados y el virus es aclarado lentamente en el tiempo. Una posible explicación de estos hechos sería la aparición de anticuerpos neutralizantes a partir del día 7° postinfección, que probablemente son capaces de eliminar células infectadas (que expresaban p30) pero no son suficientes para eliminar el virus libre adsorbido a hematíes que es la fracción circulante con mayor título de virus (Quintero *et al*, 1986; Genovesi *et al*, 1988). Con la disminución de monocitos circulantes infectados observamos que asimismo disminuía la fase sintomática y comenzaba la recuperación de los animales, a pesar de mantenerse altos los títulos de virus, por lo que éstos parecen menos críticos en el desarrollo de la infección a posteriori.

Con esta metodología, y utilizando un sistema de separación celular (separadores magnéticos, separación por citometría...) se podrían obtener sin excesivas dificultades técnicas, células viables infectadas *in vivo*, lo que permitiría poder estudiar en detalle algunos aspectos de su funcionalidad y de las interacciones del virus con el metabolismo de la célula hospedadora. Sin duda esto supondría un paso adelante en el estudio de los fenómenos de persistencia.

La metodología descrita en este apartado constituye la primera aproximación en PPA para cuantificar la proporción de células infectadas en un compartimento orgánico de cerdos infectados. Además, el anticuerpo monoclonal 174F11.8 fue muy útil en la determinación de las subpoblaciones celulares susceptibles a la infección por el virus. La disponibilidad en un futuro de anticuerpos que reconozcan diferentes poblaciones o diferentes estados de maduración de la células permitirá, en combinación con este anticuerpo, estudios más detallados de las características de las células susceptibles.

Muchos autores intentaron aplicar un valor pronóstico a los títulos de viremia desarrollados durante la infección, sin embargo este parámetro de infección no es

aplicable en términos de patogenicidad del virus en el cerdo inoculado. De forma llamativa, el porcentaje de células infectadas detectado mediante la utilización del anticuerpo frente a la proteína p30, presentó unas claras diferencias entre animales infectados con el virus atenuado que murieron en fase aguda y los que sobrevivieron al proceso, observándose un fenómeno similar en los grupos infectados con virus virulento. En todos ellos, las diferencias cuantitativas en los títulos de viremia no justifican las diferencias halladas en los porcentajes de células infectadas, que parece ser un parámetro más valioso para predecir la evolución de la infección.

La caracterización de antígenos superficiales, como marcadores de poblaciones del sistema inmunitario, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, ha permitido una mejor diferenciación de las diversas poblaciones y su implicación en las respuestas inmunitarias (Pescovitz *et al*, 1984; Davis *et al*, 1987; Emery *et al*, 1987; Fossum *et al*, 1988; Gatei *et al*, 1989; Letesson *et al*, 1991). El desarrollo creciente de reactivos frente a antígenos de diferenciación del sistema inmune porcino ha permitido un mayor conocimiento del papel de las células de la respuesta inmune en la patogenia de algunas enfermedades (Pescovitz *et al*, 1984; Hammerberg y Schurig, 1986; Lunney, 1994; Saalmüller y Bryant, 1994).

Los anticuerpos frente a antígenos superficiales en las células del sistema inmune permiten estudiar no sólo la proporción de células que los expresan, sino también la cantidad de antígeno expresado en esas células (fluorescencia media) y que puede proporcionarnos una aproximación de la capacidad funcional de dichas células (Mellencamp *et al*, 1991; González-Juarrero *et al*, 1992a; Körner y Burgert, 1994).

Para analizar las interacciones de algunas poblaciones del sistema inmune porcino con el virus de la PPA, hemos estudiado la cinética de expresión de algunos

antígenos en los diversos grupos experimentales que ya describimos en materiales y métodos.

2.A.- Respuestas que indican activación de determinados elementos del sistema inmune:

-Linfocitos T durante la infección.-

Los linfocitos T constituyen uno de los ejes del sistema defensivo orgánico frente a la agresión de agentes víricos, no sólo gracias a su capacidad de actuación directa fundamentalmente mediante mecanismos citolíticos (Wiviott *et al*, 1990; Apasov *et al*, 1993; Berke, 1994; Kägi *et al*, 1994), sino también por su acción reguladora y promotora de otros sistemas de respuesta, en especial de la inmunidad de tipo humoral inducida por los linfocitos B (Green *et al*, 1983; Lanzavecchia, 1985; Fitch *et al*, 1993; Seder y Paul, 1994). La alteración de la capacidad funcional de los linfocitos mediante la inmunosupresión farmacológica pareció influir negativamente en la evolución clínica de los animales implicados en este desarrollo experimental.

A lo largo de la infección experimental con los dos aislados del virus de la peste porcina africana utilizados, se detectó una elevación estadísticamente significativa del porcentaje de linfocitos CD8⁺ y CD4⁺. Esta elevación coincidió con los días de máxima viremia de ambos virus: los días 9-12 postinoculación con el aislado atenuado y más precozmente con el virulento (días postinfección 5-7).

En distintos sistemas víricos ha sido demostrado como es necesaria una correcta actividad de ambas poblaciones celulares CD4⁺ y CD8⁺ para producir una respuesta adecuada que libere al organismo del agente (Leist *et al*, 1987; Klarnet *et al*, 1989; Hom *et al*, 1991). El incremento durante alguna fase de la infección

por el virus de la PPA de ambas poblaciones nos indica que parece existir una estimulación antigénica de los linfocitos T en respuesta a su presencia. Estos datos señalan la importancia de la respuesta inmune de tipo celular.

En el pasado algunos autores encontraron disminución en el número global de linfocitos T durante la primera semana, medidos por formación de rosetas en hematíes de carnero (Sánchez-Vizcaíno *et al*, 1981). Pero no existen trabajos recientes evaluando subpoblaciones linfocitarias desde que están disponibles los reactivos adecuados para caracterizar dichas poblaciones en porcino, utilizando métodos más fiables de cuantificación mediante citometría de flujo.

Utilizando el aislado atenuado se obtuvieron los mismos resultados en animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos. Sin embargo, durante la infección con el aislado virulento, los cerdos tratados con ciclosporina A presentaron por el contrario una disminución significativa de la expresión de CD8 por los linfocitos, tanto del porcentaje de células como de la intensidad de fluorescencia de las mismas. La expresión de CD4 fue similar a la de los animales inmunocompetentes.

Es decir, con el virus virulento en cerdos inmunosuprimidos no se observó el incremento de la población de linfocitos CD8⁺, e incluso, estas células presentaron una menor expresión antigénica en su superficie, lo cual podría indicar una menor capacidad funcional de las mismas (Mellencamp *et al*, 1991; González-Juarrero *et al*, 1992a). Una disminución de los linfocitos CD8⁺ en otros sistemas víricos se ha relacionado con la progresión más fácil de la enfermedad (Gatei *et al*, 1989; Taylor *et al*, 1992). En este caso coincidieron con los días de máxima viremia y con el fallecimiento del 100% de los animales.

Las diferencias observadas en los grupos inmunosuprimidos nos sugieren que el efecto de la CsA, a las dosis utilizadas, es mucho más evidente a mayor estimulación antigénica, de tal forma, que el desarrollo temporal más lento de la infección atenuada podría contrarrestar mejor la reducida capacidad funcional del sistema inmunitario bajo estas condiciones (Lautenschlager *et al*, 1991).

Hemos de recordar que el efecto de la ciclosporina A es claramente dosis dependiente, variando también según el tiempo postinfección durante el cual se administre, así como según la cantidad y calidad del estímulo antigénico recibido (Altmann y Blyth, 1985; Huegin *et al*, 1985; Klaus, 1988; Bretscher y Havele, 1992).

En el grupo de cerdos inmunosuprimidos e infectados con el virus atenuado llamó la atención el comportamiento de uno de los animales que presentó una proporción anormalmente alta de linfocitos T CD4⁺ y de linfocitos CD8⁺, y murió en fase aguda de la infección. A esta rápida progresión de la enfermedad pudo contribuir la baja expresión del antígeno SLA-I en células mononucleares. Con este comentario queremos resaltar el hecho de las complicadas interrelaciones existentes en una respuesta inmune y la dificultad para implicarlas en la patogenia de un proceso.

Aun mayor que el aumento registrado en el porcentaje de linfocitos CD8⁺, fue el aumento de la intensidad media de expresión de dicho antígeno. Este hecho, junto a un aumento de la proporción de las células CD8⁺-SLA-II⁺ podría indicar la existencia de células activadas (Pantaleo *et al*, 1994). Este último dato no puede considerarse de forma aislada ya que los linfocitos porcinos expresan el SLA-II DRw de forma constitutiva en un elevado porcentaje (Lunney y Pescovitz, 1987). Para completar estos estudios podrían utilizarse además otros marcadores suplementarios como el CD11b (Mac-1) que se expresa en la membrana de linfocitos citotóxicos (McFarland *et al*, 1992); o utilizar anticuerpos frente a proteínas granulares de los linfocitos activos (Akbar *et al*, 1994), en la actualidad no disponibles en porcino.

Los linfocitos T pueden ser capaces de responder y liberar al organismo de un agente infeccioso (Zinkernagel y Althage, 1977; Byrne y Oldstone, 1986; Koziel

et al, 1993; Riddell *et al*, 1993), pero también se han visto implicados en la producción de procesos inmunopatológicos, debidos fundamentalmente, a una actividad incontrolada de los linfocitos CD8 citotóxicos (Sissons y Borysiewicz, 1985; Baezinger *et al*, 1986; Doherty *et al*, 1990; Doymaz y Rouse, 1992; Moskophidis *et al*, 1992; O'Garra y Murphy, 1993; Subak-Sharpe *et al*, 1993; Alwan *et al*, 1994). Durante estos desarrollos inmunopatológicos se pueden favorecer algunos sistemas de persistencia vírica (Moskophidis *et al*, 1992; 1993).

La evolución conjunta de los virus con el sistema defensivo linfocitario ha permitido el desarrollo de sistemas de evasión que podrían facilitar igualmente el establecimiento de infecciones persistentes (Borrow *et al*, 1991; Koup, 1994).

En órganos linfoides como el bazo, se ha observado un incremento del número de linfocitos T durante la infección con el VPPA (González-Juarrero *et al*, 1992) y en infiltrados inflamatorios inducidos durante la enfermedad se ha descrito una proporción elevada de linfocitos CD8⁺ (Martín-Fdez. *et al*, 1991). Estos hechos coinciden con nuestro hallazgo de elevados porcentajes de células CD8⁺ con mayor intensidad de expresión del antígeno en sangre periférica.

La peste porcina africana se caracteriza por el desarrollo de diferentes fenómenos inmunopatológicos (Moulton *et al*, 1975; Pan *et al*, 1975; Martín-Fdez. *et al*, 1991) y en algunas experiencias se ha demostrado la existencia de una actividad citotóxica no restringida inmunológicamente (Scholl *et al*, 1989; Martins *et al*, 1993), por lo que la actividad citotóxica desarrollada frente al virus podría estar tan implicada en una actividad defensiva como en un proceso patológico mediado en parte por el sistema inmune (Norley y Wardley, 1984; Martins *et al*, 1993).

2.B.- Antígenos de histocompatibilidad durante la infección.-

La supervivencia de un organismo depende de su capacidad para interpretar y responder a un medio ambiente en continuo cambio y a las agresiones del mismo. El sistema inmune ha evolucionado para detectar y eliminar agentes extraños en el interior del organismo. La detección de antígenos intracelulares se realiza, fundamentalmente, a través de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, capaces de transmitir señales específicas del antígeno (Germain, 1994).

Muchas de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, básicamente de los tipos I y II, han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas como reguladoras de las respuestas inmunológicas, gracias a su interacción con el complejo receptor de linfocitos T/CD3 (Bjorkman *et al*, 1987; Braciale *et al*, 1987; Neefjes y Momburg, 1993; Cresswell, 1994; Germain, 1994; Shawar *et al*, 1994).

En el intrincado mundo de las estrategias víricas de "convivencia" con el hospedador, las moléculas del MHC, como promotoras de la respuesta de tipo celular, son un candidato ideal para que su regulación influya en el devenir de la infección (Rinaldo, 1994).

En la peste porcina africana se ha observado que células del bazo de animales infectados presentan una diferente expresión de las moléculas del SLA (antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad porcino) a lo largo de la infección (González-Juarrero *et al*, 1992). Concretamente, con el aislado virulento L60 se observó una menor expresión de estos antígenos, mientras que con el aislado atenuado DR-II, tras una disminución inicial, la expresión no sólo se recupera si no que aumentó por encima de los niveles basales. Estos cambios los asocian a una estimulación de la respuesta inmune normal con el aislado atenuado y alterada en el caso del virus virulento (González-Juarrero *et al*, 1992).

Considerando nuestro modelo atenuado de infección, hemos observado que en células mononucleares de sangre periférica existe un notable incremento (2,13

veces superior a la expresión basal) de la expresión media del SLA-I durante el día 7 postinoculación, seguida de una fase final de disminución significativa de esa expresión superficial en el día 16; mientras que en el modelo virulento, el incremento observado es muy temprano (día 2) y se sigue de un descenso de la expresión media en el período crítico de máxima viremia (día 7).

El incremento de la expresión del SLA-I observado en el modelo atenuado puede reflejar un estado normal de activación celular en respuesta a la presencia agresiva del virus. Uno de los animales que presentó una expresión de SLA-I prácticamente nula en células de sangre periférica, padeció una forma aguda de la misma, es decir una evolución a la muerte. Así también en el modelo virulento, la disminución de la expresión respecto a los valores basales coincide con el fatal desenlace del proceso. Parece pues evidente, que el momento durante el cual se produzca la modulación antigénica puede ser decisivo en el resultado final del proceso infeccioso (Grundy y Downes, 1993).

En los animales inmunosuprimidos, tanto atenuados como virulentos, no se observó ningún incremento importante de la expresión total del SLA-I, durante el período crítico (día 7); sólo apareció más retrasada (día 12) en el caso del modelo atenuado. Por contra sí apareció un descenso más notable de la expresión en el modelo virulento en el día 7, coincidiendo con su homólogo no inmunosuprimido.

Cuando se estudió la expresión del SLA-I en cerdos crónicos, se observó una modulación de la expresión en 3 subpoblaciones diferenciadas dentro de toda la población de leucocitos periféricos, respecto a una expresión más uniforme de días previos. Esto refleja el diferente estado de activación de las poblaciones celulares, de acuerdo con el posible papel que pueden desempeñar en esa fase crónica. En ese momento fueron los linfocitos los que expresaron mayor proporción de SLA-I.

Esta modulación de los antígenos de histocompatibilidad puede ser ejercida mediante la síntesis de proteínas víricas que alteren las rutas metabólicas de estos

antígenos, limitando su expresión en membrana durante algunas fases del ciclo vírico (Burgert y Kvist, 1985; Pääbo *et al*, 1986; Mellencamp *et al*, 1991; Domanico y Pierce, 1992; Campbell y Slater, 1994; Körner y Burgert, 1994; Warren *et al*, 1994) o también mediante la acción sobre algunas citoquinas, como el IFN- γ , capaces de estimular la expresión de estas moléculas (Rinaldo, 1994).

Por otra parte, la actividad reguladora de un virus no sólo puede actuar inhibiendo o limitando la expresión de determinadas proteínas, sino que, según las circunstancias, las infecciones víricas pueden inducir una mayor expresión de estos mismos antígenos celulares (Rinaldo, 1994).

La respuesta celular, debida a la presencia de antígenos extraños, provoca un incremento normal de la expresión de las moléculas del MHC (Rinaldo, 1994), pero el mismo fenómeno puede asociarse con un incremento de los procesos de tipo autoinmune en el organismo (Campbell y Milner, 1993; Lehman *et al*, 1993).

Un mismo virus puede tener la capacidad de inducir diferentes tipos de modulación antigénica (positiva o negativa), y el efecto en uno u otro sentido dependerá del tipo celular implicado y del momento en el que se produzca la interacción, cambiando así la progresión de la enfermedad (Rinaldo, 1994).

El porcentaje de células mononucleares de sangre periférica que expresaron SLA-II fue significativamente superior ($p < 0,02$) en el día 7 postinfección en nuestro modelo atenuado, incremento que también fue significativo en el mismo momento para la fluorescencia media de las células positivas ($p < 0,05$). Esta tendencia se invirtió posteriormente, disminuyendo significativamente la expresión media del SLA-II en el día 16. En los cerdos infectados con el aislado E70 virulento hay una ligera disminución inicial tanto del porcentaje de células SLA-II⁺ como de la expresión antigénica en las mismas, seguido de un aumento poco importante respecto a la cifra basal.

La expresión del SLA-II en el modelo atenuado y tratado con CsA se

presentó retrasada respecto al homólogo no inmunosuprimido, apareciendo al igual que en ellos un descenso significativo de la expresión media en el día 16. Estos datos *podrían indicar que el tratamiento con CsA también incidió sobre las respuestas de tipo celular, produciendo al menos un retraso de las mismas con respecto a la respuesta habitual. La disminución de la proporción de células SLA-II⁺, así como en la expresión antigénica media de las mismas también se encontró disminuida en el día 7 en los animales del modelo E70 inmunosuprimidos, factores que también parecen apoyar el retraso en la respuesta celular inducido por la CsA.*

Con estos datos, parece claro que la activación de la respuesta inmune es "adecuada" durante la primera semana de infección con el VPPA atenuado, y que una posterior disminución de la expresión antigénica del complejo mayor de histocompatibilidad a partir del día 16, *podría contribuir al desarrollo de una infección persistente* (Ahmed y Stevens, 1990; Oldstone, 1991; Gooding, 1992).

El efecto de la modulación antigénica del virus sobre la patogenia de la enfermedad podría ser complementado, a medida que estén disponibles los reactivos adecuados, con un estudio más detallado de otros antígenos de adhesión que influyen de forma decisiva en los procesos inmunológicos (Dransfield *et al*, 1990; Grundy y Downes, 1993; Collins *et al*, 1994). Día a día resurge la importancia de la modulación de la expresión de antígenos superficiales durante las enfermedades víricas en la patogenia de estos procesos (Tyler y Fields, 1990; Rinaldo, 1994), y para un virus tan complejo como el VPPA muchas de tales interacciones permanecen aún ocultas al conocimiento general.

2.C.- Modulación de antígenos de histocompatibilidad *in vitro*.-

En nuestros experimentos *in vitro* también hemos podido comprobar la

existencia de una modulación de los antígenos de histocompatibilidad, con una inhibición de la expresión superficial del SLA-II en macrófagos maduros infectados, para todos los aislados probados tanto atenuados como virulentos; así como un incremento de la expresión del SLA-I para esos mismos aislados.

Sin embargo, cuando estudiamos la expresión de SLA-I en monocitos más inmaduros a las 24 horas postinfección, observamos diferencias entre las células infectadas con el aislado virulento, cuya expresión fue menor que la de células no infectadas, y las células infectadas con el aislado atenuado que presentaron que presentaron una expresión más elevada de SLA-I. Esto sugiere que el estado de maduración de las células infectadas puede influir en la modulación antigénica realizada por el virus. De hecho, ya se había descrito la diferente susceptibilidad a la infección por el virus de distintas poblaciones de macrófagos, según su estado de diferenciación (McCullough *et al*, 1993).

Otros datos publicados sobre cultivos de macrófagos infectados señalan una disminución de la expresión del SLA-I en dos aislados probados de diferente virulencia y un incremento con el aislado atenuado DR-II; así como una disminución de la expresión del SLA-II DRw a las 12 horas de la infección. A tiempos anteriores encontraron diferencias en la expresión de estos antígenos entre los diferentes aislados (González-Juarrero *et al*, 1992a).

Estos ensayos fueron realizados a distinta multiplicidad de infección (20 veces mayor que la nuestra) y con otros aislados del VPPA, lo que explica las diferencias encontradas.

Todo lo hasta ahora expuesto, unido a las observaciones realizadas *in vivo* indica que el virus de la PPA produce una modulación de la expresión de los antígenos de histocompatibilidad, cuya importancia radica en el desarrollo de infecciones persistentes (Rinaldo, 1994). Esta modulación de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad depende, probablemente, del estado de maduración de las células que se infectan e incluso de la multiplicidad de infección.

2.D.- Linfocitos B durante la infección.-

Los linfocitos B constituyen una población celular destinada a ejercer la defensa humoral del organismo. Esta actividad la ejercen gracias a la compleja elaboración de anticuerpos específicos frente al antígeno que produjo la estimulación; así como mediante su posterior diferenciación en células memoria. Estos linfocitos memoria son capaces de reaccionar de forma inmediata y más eficaz ante una nueva llegada del antígeno (Gray *et al*, 1991; Roitt, 1992; Kantor y Herzenberg, 1993; Gray, 1994; Janeway y Bottomly, 1994).

El desarrollo de los linfocitos B memoria es un proceso T dependiente ya que antígenos que no estimulan los linfocitos B a través de la interacción con linfocitos T (antígenos T independientes), no inducen la producción de memoria inmunológica (Gray, 1994). La unión del CD40 en la superficie de linfocitos B con su ligando en la superficie de linfocitos T colaboradores es una interacción fundamental en la formación de linfocitos B memoria (Banchereau *et al*, 1994).

Los linfocitos B pueden actuar, en otras circunstancias, como células concentradoras y presentadoras de antígeno (Lanzavechia, 1985, 1986), favoreciendo la transmisión de señales de estimulación hacia los linfocitos T (Nabavi *et al*, 1992; Boussiotis *et al*, 1993; Allison, 1994).

Durante la infección experimental de los cerdos con el aislado E75 atenuado hemos identificado, en el día 7 postinoculación, la existencia de un incremento significativo ($p < 0,05$) de la proporción de linfocitos B así como de su expresión superficial de IgM. En este momento se detectó la presencia en sangre de anticuerpos específicos frente al virus. El incremento de linfocitos B fue transitorio y disminuyó inmediatamente después, manteniéndose a niveles basales hasta el

final de nuestro desarrollo experimental.

Estas variaciones podrían indicar una activación inicial de linfocitos B, momento durante el cual se requiere un número mayor de células formadoras de anticuerpos para mantener un título idóneo de los mismos, y que disminuye sus requerimientos numéricos cuando se forman los linfocitos memoria (Bachmann *et al*, 1994).

En los cerdos inmunosuprimidos se apreció un aumento de la proporción de linfocitos B de menor nivel que el descrito para los cerdos inmunocompetentes, aunque se mantuvo durante más tiempo. Sin embargo, los resultados de la titulación de anticuerpos y del efecto neutralizante de los mismos indica una menor capacidad funcional de estas células durante la inmunosupresión. Desequilibrios en la funcionalidad de los linfocitos B tras la administración de ciclosporina A han sido descritos por otros autores (Klaus, 1988; Wicker *et al*, 1992; Bretscher y Havele, 1992).

Las variaciones de esta población en el modelo virulento carecen del interés del modelo anterior, debido al desarrollo agudo del proceso. Tanto en los cerdos inmunocompetentes como en los inmunosuprimidos se desarrolla un temprano incremento (día 2) de los linfocitos B, que podría significar una primera movilización de células ante la presencia del virus, hacia lugares de presentación antigénica (Kelsoe y Zheng, 1993). Posteriormente caen los valores, alcanzando un mínimo el día 7, al contrario que en los animales inoculados con el aislado atenuado.

2.E.- Variaciones que apuntan a un posible defecto funcional del sistema inmune.-

La expresión del receptor de interleuquina 2 presentó una inhibición a lo largo de la infección experimental, tanto con virus virulento como atenuado. Esta

inhibición podría estar relacionada con la alteración de algunas respuestas proliferativas observadas en nuestros estudios *in vitro*. Al inicio de la infección existían diferencias significativas entre animales con o sin tratamiento con ciclosporina A, ya que uno de los mecanismos de acción del inmunosupresor es la disminución de la expresión del receptor de interleuquina 2 (Kasaian y Biron, 1990). El efecto de la infección es que tienden a igualarse estas diferencias, bajando la expresión de los cerdos normales infectados incluso por debajo de la de los animales sometidos a inmunosupresión farmacológica.

La expresión del receptor de IL-2 en linfocitos constituye un marcador de activación (Strauchen y Breakstone, 1987; Bailey *et al*, 1992; Minami *et al*, 1993). Su disminución durante la infección podría explicarse por la retención de linfocitos más activos en centros orgánicos de estimulación antigénica o de respuesta inmunológica, lo que determinaría diferencias temporales en las células de sangre periférica (Jonjic *et al*, 1986; Mackay, 1993; Binns, 1994; Binns y Pabst, 1994).

Sin embargo, parece más probable que una inhibición de la expresión del receptor de IL2 en linfocitos, tras la exposición de las células al virus o por la acción de citoquinas producidas durante la infección, induzca una menor capacidad de respuesta en estas células. La interacción de la IL-2 con su receptor durante la fase G₁ del ciclo celular es necesaria para iniciar la síntesis de ADN y delimita el desarrollo posterior de la respuesta inmune (Cantrell y Smith, 1984).

Los virus, en su evolución en estrecha convivencia con los organismos hospedadores, y en su continua interacción con el sistema inmunitario, han desarrollado diferentes capacidades que les permiten evitar los sistemas de respuesta, con la intención de favorecer una convivencia de larga duración. Sin duda alguna, uno de los sistemas más extendidos de evasión es la interacción de los virus con linfocitos T en sus diferentes poblaciones (Doherty, 1985; McChesney y Oldstone, 1987; Pircher *et al*, 1990). Esta interacción puede ser ejercida de forma directa, por la infección de las células (McChesney y Oldstone, 1987), o de forma indirecta como en el caso del virus que nos ocupa.

Coincidiendo con otros autores, no hemos encontrado infección directa de linfocitos por el VPPA (Wardley y Wilkinson, 1977; Casal *et al*, 1984; Knudsen *et al*, 1987; Minguez *et al*, 1988; Alcamí *et al*, 1990; Carrillo *et al*, 1994). Una interacción indirecta con los sistemas de inmunidad linfocitaria parece ser un distintivo de la infección vírica por el VPPA, produciendo inmunosupresión que puede ser debida a sobreestimulación como han sugerido algunos autores (Santos-Ribeiro *et al*, 1991).

En peste porcina africana se ha observado, tanto *in vivo* (Sánchez-Vizcaíno *et al*, 1981) como *in vitro* (González *et al*, 1990; Canals *et al*, 1992), una alteración de algunos tipos de respuesta celular de los linfocitos frente a diversos estímulos, lo cual podría tener su origen en la baja expresión superficial del receptor de IL-2.

Además, la existencia de una proporción importante de células nulas (dobles negativas CD4⁻CD8⁻) en sangre periférica de cerdos puede proporcionar otra fuente de variabilidad tras su activación y recirculación (Saalmüller *et al*, 1989; 1990; Binns, 1994; Havran y Boismenu, 1994; Saalmüller y Bryant, 1994). La función de estas células durante la respuesta inmunitaria no está bien caracterizada, aunque se cree son tan relevantes en la defensa orgánica como otras subpoblaciones (Haas *et al*, 1993).

2.F.- La célula diana: Monocitos/macrófagos durante la infección.-

La infección se comportó como un estímulo para la población de monocitos/macrófagos de sangre periférica, ya que aumentó de forma significativa tanto la proporción de células como la fluorescencia media de las mismas, y en ambos modelos víricos. Con el virus atenuado, los valores altos se obtuvieron la

primera y segunda semana (incremento más temprano y sostenido en los cerdos inmunosuprimidos).

Tras la infección con el virus virulento E70 esta estimulación fue precoz, para disminuir bruscamente los días previos a la muerte de los animales, característica no presentada por el grupo inmunosuprimido en el que incluso aumentaron los porcentajes estos mismos días (abogando por una destrucción inmunomediada de las células).

Las células del SMF, y con mayor tendencia los macrófagos tisulares, constituyen la principal célula diana del virus de la PPA (Coggins, 1966; Wardley y Wilkinson, 1977; Forman *et al*, 1983; Casal *et al*, 1984; McVicar, 1984; Mínguez *et al*, 1988; Alcamí *et al*, 1990). En estas células el virus induce un efecto citopático *in vitro*, con características de redondeamiento, formación de grupos celulares y lisis final igual para todos los aislados (Knudsen *et al*, 1987). El efecto observado *in vivo* sobre los macrófagos es, sin embargo, marcadamente diferente dependiendo de la virulencia del aislado, con predominio de lisis y destrucción en modelos virulentos (Moulton y Coggins, 1968) y presencia de hiperplasia e hipertrofia de macrófagos tras la infección con aislados atenuados (Moulton y Coggins, 1968; Konno *et al*, 1969; 1972; Mínguez *et al*, 1988; González-Juarrero *et al*, 1992).

Un virus que sea capaz de replicarse de forma efectiva en macrófagos puede evitar la primera barrera defensiva del organismo, y extenderse no sólo a otras células dentro de ese tejido sino también a otros tejidos, gracias a la elevada capacidad quimiotáctica de los macrófagos (Matloubian *et al*, 1993). Con ello se facilitan los medios para alterar el inicio y la magnitud de la respuesta inmune (Gartner *et al*, 1986; Ho *et al*, 1986; Esolen *et al*, 1993). Si además le unimos el hecho de que en la PPA el virus se vehicula con altísima efectividad adsorbido a eritrocitos nos demuestra la extraordinaria capacidad de diseminación orgánica de este virus (McVicar, 1984; Quintero *et al*, 1986; Genovesi *et al*, 1988).

Esta alta potencialidad de distribución le hemos comprobado tras los

estudios de inmunohistoquímica realizados por nosotros y por otros autores (Fernández *et al*, 1992a; 1992b).

En el bazo de animales infectados con una cepa virulenta del virus se ha descrito una disminución de la tinción con el anticuerpo 74-22-15, durante los momentos de mayor presencia de antígeno vírico. Con la cepa atenuada DR-II los cambios fueron escasos o bien hubo un incremento de la tinción de macrófagos en las zonas de elipsoides (González-Juarrero *et al*, 1992).

En la sangre periférica de los cerdos infectados con el aislado atenuado E75 se manifestó un incremento de la proporción de monocitos SWC₃⁺ entre los días 5-12, con un máximo en el día 7. Esta movilización de monocitos se produjo también en los cerdos tratados con ciclosporina A, aunque en este caso fue más temprana (día 2).

En cultivos de macrófagos porcinos se han obtenido poblaciones celulares infectadas de forma persistente, en lugar de sufrir la lisis habitual, cuando, para un mismo aislado, se disminuyó la multiplicidad de infección del mismo en el cultivo (Wardley y Wilkinson, 1977). Esto nos lleva a pensar que el ritmo de replicación *in vivo* puede ser importante a la hora de desarrollar infecciones agudas o crónicas.

ADN del virus de la PPA ha sido aislado de monocitos/macrófagos de sangre periférica durante infecciones de larga duración (Carrillo *et al*, 1994), al igual que lo observado en otros modelos víricos (Taylor-Wiedeman *et al*, 1991), constituyendo así una de las poblaciones fundamentales a la hora de desarrollar infecciones víricas persistentes y uno de los mejores sistemas de diseminación orgánica (Haywood, 1986; Oldstone, 1989; Ahmed y Stevens, 1990; King *et al*, 1990; Matloubian *et al*, 1993).

Durante la infección de los macrófagos por un virus, puede observarse una alteración de algunas funciones celulares (Mebus y Gregg, 1985), así como de los procesos de secreción normal de las células infectadas (Santos Ribeiro *et al*, 1991; Esser *et al*, 1991). Estos fenómenos pueden determinar ciertos efectos inmunológicos que han sido observados en Peste Porcina Africana y en otras enfermedades (Esser *et al*, 1991).

En el modelo virulento E70, a pesar de haber observado una temprana liberación de monocitos a sangre periférica, posteriormente parecen destinados a su destrucción y, en el día séptimo, momento álgido del proceso agudo, aparecen considerablemente disminuidos en sangre periférica y destruidos en los tejidos.

Los fenómenos líticos parecen superar aquí la capacidad productiva de la médula ósea (González-Juarrero *et al*, 1992). Sin embargo, en animales inmunosuprimidos, la proporción de monocitos se mantiene bastante estable durante la infección, abogando hacia una lisis inmunomediada de las células infectadas como un factor a tener en consideración en la patogenia de la enfermedad (Odermatt *et al*, 1991).

En otros sistemas víricos la destrucción inmunomediada por linfocitos CD8 citotóxicos se ha considerado la causante de la eliminación de células foliculares dendríticas de los ganglios y de los macrófagos infectados, produciendo una desorganización de estructuras linfoides y contribuyendo al establecimiento de una infección persistente (Odermatt *et al*, 1991).

En nuestro modelo de infección *in vitro*, hemos observado disminución de la expresión superficial del antígeno SWC₃, en el caso del aislado virulento, en monocitos inmaduros a las 24 horas de la infección. Sin embargo existía una expresión aumentada de dicho antígeno en células inmaduras infectadas con el aislado atenuado. González-Juarrero *et al*, (1992) observaron un comportamiento diferente de la expresión del antígeno SWC₃, aunque las diferentes condiciones de cultivo y el tipo de aislado pudieron determinar las divergencias.

Aún se desconoce la importancia funcional de este antígeno y de momento sólo se ha descrito su distribución celular (Blecha *et al*, 1994).

3.- RESPUESTAS CELULARES DURANTE LA INFECCIÓN

El efecto de la infección con el virus de la PPA sobre las respuestas celulares de los linfocitos *in vitro* ha sido caracterizado como una fuerte respuesta secundaria si se realiza en linfocitos procedentes de cerdos supervivientes a la infección; así como una inhibición de la blastogénesis, tras la estimulación con algunos mitógenos, inhibición que resultó ser mayor a mayor duración de la infección del cultivo y a mayor multiplicidad de infección, independientemente del tipo de aislado utilizado. Algunos autores refieren resultado similares (González *et al*, 1990; Canals *et al*, 1992), mientras que otros han señalado diferencias entre aislados virulentos y atenuados (Wardley, 1982; Knudsen y Genovesi, 1988).

El presente estudio aporta los datos de ausencia de respuesta a mitógenos por parte de linfocitos procedentes de sangre periférica de cerdos infectados con virus virulento y atenuado, y algunos resultados relacionados con los posibles mecanismos de inhibición de esta respuesta.

Nuestros resultados de estimulación de cultivos de células mononucleares de cerdos infectados con el virus virulentos, a los 7 días postinoculación, demuestran que existe una inhibición de la respuesta proliferativa, al igual que en células mononucleares procedentes de animales infectados con el aislado atenuado a los 16 días postinoculación; aunque en este último caso fue posible contrarrestar la inhibición con dosis elevadas de concanavalina A.

Además, la inhibición de la respuesta proliferativa de los linfocitos se acompañaba de una menor expresión del antígeno CD25 (receptor de IL-2) por los linfocitos estimulados con Concanavalina A comparados con linfocitos de cerdos

no infectados. Una excepción fue el caso del grupo inmunosuprimido e infectado con virus virulento. En este último grupo, con elevadas concentraciones de mitógeno se obtenía una expresión del receptor de IL-2 equivalente a la de cerdos testigo.

Posteriormente se analizó el efecto de la interleuquina 2 sobre cultivos de linfocitos procedentes de animales testigo que se infectaron con los diferentes modelos víricos. La inhibición de la blastogénesis, demostrada por una reducida captación de timidina radioactiva era reversible tras la adición de IL-2 en el caso del aislado atenuado, pero no con el virulento.

Los linfocitos del cultivo infectado con el virus virulento podrían haber sufrido un proceso irreversible de muerte celular, mientras que los linfocitos del cultivo atenuado bien pudieran permanecer sólo en un estado de inactivación latente que se contrarrestó por la presencia de la IL-2.

Las observaciones de las células infectadas *in vitro* con los diferentes aislados, realizadas tanto por citometría de flujo como por microscopía directa, indicaban una marcada destrucción celular en el caso del modelo virulento.

Además, la inhibición de la blastogénesis en el aislado atenuado coincidía con una paralización de las células en fase G_0/G_1 , mientras que se apreciaba un incremento notable del ADN degradado (hipoploide) en el caso del virus virulento. Los picos de ADN sub G_1 se han relacionado con la existencia de apoptosis en las células (Malorni *et al*, 1993) dando un nuevo argumento a favor de nuestra hipótesis anterior.

Esta actividad inhibitoria, desarrollada por el virus de la PPA, se ha relacionado con la presencia de una monoquina secretada en células infectadas por el virus (Wardley, 1982; Passaquala *et al*, 1988; González *et al*, 1990; Santos-Ribeiro *et al*, 1991). En otros procesos víricos la inhibición de la respuesta a

mitógenos se asocia con la inducción de apoptosis en las células inmunitarias (Ameisen y Capron, 1991; Levy, 1991; Groux *et al*, 1992; Gougeon *et al*, 1993; Razvi y Welsh, 1993; Saha *et al*, 1994; Shibata *et al*, 1994); y algunas citoquinas pueden inducir estos procesos de muerte celular programada (Lenardo, 1991; Razvi y Welsh, 1993; Fluckiger *et al*, 1994).

Tanto *in vivo* como *in vitro* el virus de la PPA produce una alteración de ciertas respuestas celulares, al menos durante determinadas fases de la infección. Otras causas posibles serían ciertos cambios en la capacidad de unión de las lectinas a la membrana de las células tras la infección de los macrófagos que pueden estar en relación con este tipo de alteraciones (Alcaraz *et al*, 1992). Otros virus productores de inmunosupresión transitoria inducen asimismo alteraciones en las respuestas celulares parecidas a las descritos (Rouse y Horohov, 1986; Newman *et al*, 1991; Chinsackchai y Molitor, 1992; Groux *et al*, 1992; Razvi y Welsh, 1993; Saha *et al*, 1994). En algunos casos se ha demostrado una correlación directa entre la virulencia del virus y la supresión de las respuestas proliferativas asociadas a la enfermedad (Newman *et al*, 1991).

Los fenómenos de apoptosis en algunas fracciones celulares durante las enfermedades víricas, en principio podrían limitar la capacidad productiva de los virus (Levine *et al* 1993; Shibata *et al*, 1994) o limitar la expansión incontrolada de algunas poblaciones celulares (Uehara *et al*, 1992; Akbar *et al*, 1994), pero en definitiva pueden llegar a producir graves efectos deletereos por la inducción de fenómenos de tolerancia (Lenardo, 1991; Green y Scott, 1994) o por el desarrollo de una inmunosupresión en el hospedador (Ameisen y Capron, 1991; Groux *et al*, 1992; Gougeon *et al*, 1993; Razvi y Welsh, 1993; Saha *et al*, 1994).

Algunas infecciones víricas pueden favorecer un estado de elevada sensibilidad a la apoptosis inducida tras la activación de linfocitos T (posiblemente como consecuencia de un mecanismo vírico anti-inmune) independiente de la infección directa de estas células por el virus, produciendo la aparición de

inmunodeficiencias o inmunopatologías (McCabe y Orrenius, 1992; Uehara *et al*, 1992; Razvi y Welsh, 1993; Green y Scott, 1994).

La apoptosis podría servir también como un mecanismo de tolerancia a antígenos extremadamente abundantes; si son inocuos, como en el caso de antígenos propios, entonces es adecuada la inexistencia de respuesta inmune. Si el antígeno en exceso deriva de un agente infeccioso, la inmunidad podría hacer poco para proteger al hospedador de la sobreinfección, y por lo tanto, las consecuencias de limitar la respuesta inmune en este caso son evolutivamente irrelevantes (Uehara *et al*, 1992; Green y Scott, 1994).

Las vías metabólicas que conducen a la activación de las células pueden ser las mismas que estimulen los fenómenos de apoptosis, dependiendo de factores como el estado de diferenciación de las células o la existencia de otras señales coestimuladoras y el momento en que éstas se produzcan (King y Ashwell, 1993; Green y Scott, 1994; Nishioka y Welsh, 1994; Punt *et al*, 1994; Salmon *et al*, 1994).

Son muchos los factores que pueden interaccionar para inducir o inhibir las vías de muerte celular programada, algunos de ellos son características intrínsecas de las células como la presencia de antígenos superficiales (Fas, R-TNF...) o la posesión de determinados genes (p53, bcl-2, c-myc,...) (Itoh *et al*, 1991; King y Ashwell, 1993; Boise *et al*, 1993; Clarke *et al*, 1993; Lowe *et al*, 1993; Oltvai *et al*, 1993; Rouvier *et al*, 1993; Crabtree y Clipstone, 1994; Lowin *et al*, 1994; Strasser *et al*, 1994; Alderson *et al*, 1995); otros son moléculas producidas durante la respuesta celular al agente agresor, como algunas citoquinas (TNF, IL-2, IL-10,...) (Golstein *et al*, 1991; Lenardo, 1991; Razvi y Welsh, 1993; Fluckiger *et al*, 1994).

Nuestros resultados indican que diferentes aislados víricos atenuados del VPPA, así como alguno de los virulentos, inducen una disminución de los

fenómenos de apoptosis en los cultivos celulares, inhibición que fue más evidente a mayor tiempo en cultivo. En las condiciones habituales de cultivo de linfocitos, la apoptosis es un proceso frecuente que se tomó como referencia basal en cada caso y que resultó ser inhibida por algunos aislados del VPPA.

Por otra parte se conoce al menos un gen con homología con genes inhibidores de la apoptosis en el genoma del VPPA (Neilan *et al*, 1993), y hemos intentado estudiar la posible inhibición *in vitro* de la muerte celular programada con diferentes aislados.

Algunos virus virulentos (E70 y E75), no sólo no redujeron el nivel basal de apoptosis de las células sin infectar, sino que incluso incrementaron la muerte celular por apoptosis, siendo mayor el incremento a más tiempo en cultivo.

Si bien la diferente regulación en la expresión genómica del virus en unos y otros aislados pudo influir en las diferencias observadas, no podemos descartar una distinta inducción de citoquinas o con distinta secuencia temporal durante la infección (Passaquala *et al*, 1988; González *et al*, 1990; Santos-Ribeiro *et al*, 1991).

La inhibición de la apoptosis, si se produce *in vivo*, explicaría algunas características histopatológicas de los tejidos linfoides con PPA subaguda o crónica, los cuales presentan una masiva hiperplasia, a diferencia de los procesos agudos en los que se desarrolla una marcada destrucción celular. Estas diferencias podrían explicarse como una inhibición de los fenómenos de apoptosis en el tejido linfoide en los procesos subagudos y crónicos, lo cual pudiera incluso favorecer la aparición de lesiones proliferativas pseudotumorales en algunos órganos, similares a las observadas en otros procesos víricos (Gregory *et al*, 1991; Lee y Yates, 1992; Schena *et al*, 1992; Williams y Smith, 1993).

Posiblemente, la destrucción de monocitos y de células presentadoras de antígeno durante la patogenia de los procesos agudos, podría implicarse en la inducción de una muerte celular programada, al producir una activación celular sin las adecuadas señales coestimuladoras (Green y Scott, 1994).

En algunas infecciones víricas, una inhibición de los fenómenos de apoptosis favorecería el desarrollo de persistencias víricas (Gregory *et al*, 1991; Williams y Smith, 1993). Sin embargo, en procesos agudos el aspecto morfológico de los tejidos linfoides, con escasas células vivaces, es característica de apoptosis y sugiere que el estímulo de los procesos de apoptosis tengan gran influencia en la patogenia de la PPA aguda. La gran destrucción celular que se desarrolla en la infección con distintos aislados virulentos del VPPA, y que es muy selectiva de órganos linfoides, es semejante a la de otros procesos víricos con apoptosis (Odermatt *et al*, 1991; McCabe y Orrenius, 1992; Razvi y Welsh, 1993; Saha *et al*, 1994).

Las diferentes pruebas realizadas *in vitro* con agentes capaces de influir sobre los procesos de apoptosis, como el mitógeno concanavalina A, la citoquina IL-2 o el inmunosupresor ciclosporina A demuestran una vez más la importancia de la diferente cinética de los aislados víricos en la regulación de la respuesta celular (Shi *et al*, 1989; Lenardo, 1991; King y Ashwell, 1993; Razvi y Welsh, 1993).

Por ejemplo la IL-2 puede inducir o detener los fenómenos de apoptosis dependiendo de la presencia de otras señales coestimuladoras y del momento que actúe sobre las células (Lenardo, 1991; Razvi y Welsh, 1993). En nuestros experimentos esta linfoquina actuó inhibiendo la apoptosis en cultivos infectados con aislado virulento, mientras que en cultivos infectados con el aislado atenuado se incrementó la proporción de células muertas por apoptosis, siempre respecto a los cultivos sin infectar. Un fenómeno parecido se observó con el mitógeno concanavalina A, de forma que el retraso en la infección celular con el aislado atenuado podría favorecer los fenómenos de apoptosis cuando existe en el medio este mitógeno, aún manteniendo cierto grado de inhibición respecto al control. Por último, la ciclosporina A siempre actuó reduciendo el nivel de apoptosis de los sistemas en los cuales no existía este inmunosupresor.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- Se ha contribuido a una mejor caracterización de la patogenia de dos modelos víricos de gran importancia. El modelo atenuado E75CV₁-4 que induce protección frente al virus homólogo virulento y durante nuestras infecciones experimentales desarrolló diversos cursos clínicos similares a los observados en la naturaleza.

El modelo virulento E70 es un virus de elevada mortalidad y morbilidad que en nuestros animales evolucionó uniformemente hacia formas clínicas agudas.

2.- La inmunosupresión no modificó básicamente el desarrollo de la infección. Con el modelo virulento se reproducía el curso agudo característico y con el atenuado se obtuvo la misma proporción de animales que desarrollaban cuadros agudos y subagudos. Sin embargo aumentó la mortalidad de animales con formas subagudas de la enfermedad. No se observaron reagudizaciones comenzando la inmunosupresión en las fechas de máxima viremia.

3.- Los cerdos inmunosuprimidos presentaron viremias elevadas incluso después de la segunda semana postinfección. Presentaron fiebre durante períodos más largos de tiempo y las temperaturas fueron significativamente más altas que en los animales inmunocompetentes. Además el patrón hematológico fue diferente: la leucopenia con linfopenia y neutrofilia se convirtió en linfocitosis con neutropenia en los animales tratados con ciclosporina A.

4.- La proteína de membrana P30 se detectó principalmente en células del sistema monocitario/macrofágico y en un pequeño porcentaje de granulocitos en sangre periférica. Los porcentajes de células expresando P30 dentro de la fracción de células susceptibles variaron a lo largo de la infección, demostrando una correlación positiva con los títulos de virus en sangre. Este anticuerpo constituye así un buen marcador cuantitativo para la evolución de la infección *in vivo*.

Mediante la utilización de técnicas de inmunohistoquímica en órganos de animales infectados con el virus virulento se observó una mayor presencia de antígeno vírico en tonsilas, ganglios linfáticos, bazo y pulmones. En estos y otros órganos las células más frecuentemente infectadas fueron células del SMF. En los animales inmunosuprimidos no se detectaron variaciones del tropismo y distribución del virus.

5.- Durante la infección experimental con el aislado atenuado se detectaron variaciones de interés en las poblaciones periféricas de linfocitos, destacando un máximo porcentaje de linfocitos CD8⁺ y CD4⁺ entre los días 9 y 12 postinfección. En la infección en animales inmunosuprimidos los linfocitos también presentaron una máxima proporción en esos mismos días.

6.- La población de monocitos/macrófagos de sangre periférica presentó un incremento significativo en cerdos infectados con el virus atenuado. Este aumento fue temprano en los cerdos inmunosuprimidos, desde el día 2, manteniéndose una proporción alta hasta el día 14 postinoculación.

Tras la infección con el virus virulento E70 esta población periférica estuvo porcentualmente disminuida previo a la muerte de los animales, característica no presentada por el grupo inmunosuprimido, abogando por una destrucción inmunomediada de las células.

7.- El VPPA produjo una modulación de la expresión de los antígenos de histocompatibilidad tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta modulación fue de sentido diferente a lo largo de la infección experimental. La existencia de una disminución significativa de la expresión de ambos antígenos a partir de la tercera semana de infección con el virus atenuado parece implicarlos en la evasión del sistema inmune y en el desarrollo de persistencias.

In vitro las variaciones de la expresión de SLA-I y SLA-II fueron opuestas y cuantitativamente distintas según la cepa implicada.

8.- La expresión del receptor de IL-2 fue inhibida a lo largo del período de infección experimental tanto por virus virulento como atenuado, alcanzando valores inferiores a los de animales inmunosuprimidos farmacológicamente. Esta inhibición podría estar relacionada con la alteración de algunas respuestas proliferativas observadas *in vitro*.

9.- El VPPA interfirió con el proceso de apoptosis en cultivo de linfocitos. Los virus atenuados produjeron una inhibición de la muerte celular programada, mientras que los aislados virulentos aumentaron dicho proceso. Estas observaciones se relacionan con el hallazgo de genes del virus con homología con genes celulares o de otros virus con efecto similar y con los hallazgos histopatológicos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, A.K. (1987). "Cellular interactions in the immune response. The roles of B Lymphocytes and IL-4." *Am. J. Pathol.*, 129, 26-33.
- ADLINGER, H.K.; STONE, S.S.; HESS, W.R.; BACHRACH, H.L. (1966). "Extraction of infectious deoxyribonucleic acid from ASFV." *Virology*, 30, 750-752.
- AFONSO, C.L.; ALCARAZ, C.; BRUN, A.; SUSSMAN, M.D.; ONISK, D.V.; ESCRIBANO, J.M.; ROCK, D.L. (1992). "Cloning and characterization of p30, a membrane and secreted protein of ASFV." *Virology*, 189, 368-373.
- AFONSO, C.L.; BRUN, A.; YOZAWA, T.; BORCA, M.V.; SUSSMAN, M.D.; ROCK, D.L. (1994). "African swine fever virus gene 23-NL encodes a 23 kD nuclear protein." 10th International Conference on Poxviruses and Iridoviruses. Banff, Canada.
- AGÜERO, M.; BLASCO, R.; WILKINSON, P.; VIÑUELA, E. (1990). "Analysis of naturally occurring deletion variants of ASFV: multigene family 110 is not essential for infectivity or virulence in pigs." *Virology*, 176, 195-204.
- AHMED, R.; OLDSTONE, M.B.A. (1983). "Mechanisms and biological implications of virus induced polyclonal B cell activation." in Notkins, A.L.; Oldstone, M.B.A. "Concepts in viral pathogenesis.". Springer Verlag. New York.
- AHMED, R.; OLDSTONE, M.B.A. (1988). "Organ specific selection of viral variants during chronic infection." *J. Exp. Med.*, 167, 1719-1724.
- AHMED, R.; STEVENS, J.G. (1990). "Viral persistence." in *Virology*, second edition, edited by B.N. Fields; D.M. Knipe *et al.*, Raven Press. Ltd. New York.
- AHMED, R.; KING, C.C.; OLDSTONE, M.B.A. (1987). "Virus-lymphocyte interaction: T cells of the helper subset are infected with LCMV during persistent infection *in vivo*". *J. Virol.*, 61, 1571-1576.
- AKBAR, A.N.; SAVILL, J.; GOMBERT, W.; BOFILL, M.; BORTHWICK, N.J.; WHITELAW, F.; GRUNDY, J.; JANOSSY, G.; SALMON, M. (1994). "The specific recognition by macrophages of CD8⁺, CD45RO⁺ T cells undergoing apoptosis: a mechanism for T cell clearance during resolution of viral infections." *J. Exp. Med.*, 180, 1943-1947.

- ALCAMÍ, A.; VIÑUELA, E. (1991). "Fc receptors do not mediate ASFV replication in macrophages." *Virology*, 181, 756-759.
- ALCAMÍ, A.; CARRASCOSA, A.L.; VIÑUELA, E. (1989). "Saturable binding sites mediate the entry of ASFV into Vero cells." *Virology*, 168, 393-398.
- ALCAMÍ, A.; CARRASCOSA, A.L.; VIÑUELA, E. (1990). "Interaction of African Swine Fever Virus with macrophages". *Virus research*, 17, 93-104.
- ALCARAZ, C.; ÁLVAREZ, A.; ESCRIBANO, J.M. (1992). "Flow cytometry analysis of ASFV-induced plasma membrane proteins and their humoral immune response in infected pigs." *Virology*, 189, 266-273.
- ALCARAZ, C.; BRUN, A.; RUÍZ-GONZALVO, F.; ESCRIBANO, J.M. (1992a). "Cell culture propagation modifies the ASFV replication phenotype in macrophages and generates viral subpopulations differing in protein p54." *Virus Res.*, 23, 173-182.
- ALCARAZ, C.; LAVIADA, M.D.; ESCRIBANO, J.M. (1988). "Análisis mediante electroforesis bidimensional de las proteínas inducidas por el virus de la PPA y sus propiedades antigénicas." *Med. Vet.*, 5, 353-358.
- ALCARAZ, C.; PASAMONTES, B.; RUIZ-GONZALVO, F.; ESCRIBANO, J.M. (1989). "ASFV-induced proteins on the plasma membranes of infected cells." *Virology*, 168, 406-408.
- ALDERSON, M.R.; TOUGH, T.W.; DAVIS-SMITH, T.; BRADDY, S.; FALK, B.; SCHOOLEY, K.A.; GOODWIN, R.G.; SMITH, C.A.; RAMSDELL, F.; LYNCH, D.H. (1995). "Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes." *J. Exp. Med.*, 181, 71-77.
- ALEXANDERSEN, S.; STORGAARD, T.; KAMSTRUP, N.; AASTED, B.; PORTER, D.D. (1994). "Pathogenesis of aleutian mink disease parvovirus infection: effects of suppression of antibody response on viral mRNA levels and on development of acute disease." *J. Virol.*, 68, 738-749.
- ALLISON, J.P. (1994). "CD28-B7 interactions in T cell activation." *Curr. Op. Immunol.*, 6, 414-419.
- ALMAZÁN, F.; RODRÍGUEZ, J.M.; ANGULO, A.; VIÑUELA, E.; RODRÍGUEZ, J.F. (1993). "Transcriptional mapping of a late gene coding for the p12 attachment protein of ASFV." *J. Virol.*, 67, 553-556.
- ALMEIDA, J.C.; WATERSON, A.P.; PLOWRIGHT, W. (1967). "The morphological characteristics of African Swine fever virus and its resemblance to Tipula iridescent virus." *Arch. Ges. Virusforsch.*, 20, 392-396.

- ALMENDRAL, J.M.; ALMAZÁN, F.; BLASCO, R.; VIÑUELA, E. (1990). "Multigene families in ASFV: family 110." *J. Virol.*, 64, 2064-2072.
- ALTHAGE, A.; ODERMATT, B.; MOSKOPHIDIS, D.; KUNDIG, T.; HOFFMAN-ROHRER, U.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. (1992). "Immunosuppression by Lymphocytic Choriomeningitis virus infection: competent effector T and B cells but impaired antigen presentation." *Eur. J. Immunol.*, 22, 1803-1812.
- ALTMANN, D.M.; BLYTH, W.A. (1985). "The effects of cyclosporin A on the induction, expression and regulation of the immune response to Herpes simplex virus." *Clin Exp. Immunol.*, 59, 17-22.
- ALWAN, W.H.; KOZLOWSKA, W.J.; OPENSHAW, P.J.M. (1994). "Distinct types of lung disease caused by a functional subset of antiviral T cells." *J. Exp. Med.*, 179, 81-89.
- AMEISEN, J.C.; CAPRON, A. (1991). "Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis." *Immunol. Today*, 12, 4, 102-105.
- ANDERSON, E.C. (1986). "ASF: Current concepts on its pathogenesis and immunology." *Rev. Sci. Off. Int. Epiz.*, 5, 477-486.
- ANDERSON, E.C.; WILLIAMS, S.M.; FISHER-HOCH, S.P.; WILKINSON, P.J. (1987). "Arachidonic acid metabolites in the pathophysiology of thrombocytopenia and haemorrhage in acute ASF." *Res. Vet. Sci.*, 42, 387-394.
- ANGULO, A.; VIÑUELA, E.; ALCAMÍ, A. (1993). "Inhibition of ASFV binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12." *J. Virol.*, 67, 9, 5463-5471.
- APASOV, S.; REDEGELD, F.; SITKOVSKY, M. (1993). "Cell-mediated cytotoxicity: contact and secreted factors." *Curr. Op. Immunol.*, 5, 404-410.
- ARIAS, M.L.; ESCRIBANO, J.M.; RUEDA, A.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. (1986). "La Peste Porcina Africana." *Med. Vet*, 3, 333-350.
- ARZUZA, O.; URZAINQUI, A.; DÍAZ-RUIZ, J.R.; TABARÉS, E. (1992). "Morphogenesis of ASFV in monkey kidney cells after reversible inhibition of replication by cicloheximide." *Arch. Virol.*, 124, 343-354.
- ASTRY, C.L.; JAKAB, G.J. (1984). "Influenza virus-induced immune complexes suppress alveolar macrophage phagocytosis." *J. Virol.*, 50, 287-292.
- AUNE, T.M.; PIERCE, C.W. (1982). "Activation of a supressor T-cell pathway by interferon ". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3808-3812.

- BACHMANN, M.F.; KÜNDIG, T.M.; KALBERER, C.P.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, L.M. (1994). "How many specific B cells are needed to protect against a virus?" *J. Immunol.*, 152, 4235-4241.
- BAEZINGER, J.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M.; COLE, G.A. (1986). "Induction or prevention of immunopathological disease by cloned cytotoxic T cells lines specific for lymphocytic choriomeningitis virus." *Eur. J. Immunol.*, 16, 387-393.
- BAILEY, M.; STEVENS, K.; BLAND, P.W.; STOKES, C.R. (1992). "A monoclonal antibody recognising an epitope associated with pig interleukin-2 receptors." *J. Immunol. Meth.*, 153, 85-91.
- BANCHEREAU, J.; BAZAN, F.; BLANCHARD, D.; BRIERE, F.; GALIZZI, J.P.; VAN KOOTEN, C.; LIU, Y.J.; ROUSSET, F.; SAELAND, S. (1994). "The CD40 antigen and its ligand." *Ann. Rev. Immunol.*, 12, 881-922.
- BANKS, W.J. (1993). "Applied Veterinary Histology." Mosby Year Book.
- BARINAGA, M. (1992). "Viruses launch their own 'Star Wars'." *Science*, 258, 1730-1731.
- BAROUDY, B.M.; VENKATESAN, S.; MOSS, B. (1981). "Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain." *Cell*, 28, 315-324.
- BATTEGAY, M.; OEHEN, S.; SCHULZ, M.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. (1992). "Vaccination with a synthetic peptide modulates Lymphocytic Choriomeningitis Virus-mediated immunopathology". *J. Virol.*, 66, 2, 1199-1201.
- BERGER, S. (1979). "Lymphocytes as resting cells." In *Methods of enzymology*. S. Colowick and N. Kaplan, eds. Academic Press N.Y., 58, 486-494.
- BERKE, G. (1994). "The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects ." *Ann. Rev. Immunol.*, 12, 735-774.
- BESCHOMER, W.E.; GENNARO, K.A.; HESS, D.A.; SANTOS, G.A. (1987). "CsA and the thymus: influence of irradiation and age on thymic immunopathology and recovery." *Cell Immunol.*, 110, 350-364.
- BIERER, B.E.; SOMERS, P.K.; WANDLESS, T.J.; BURAKOFF, S.J.; SCHREIBER, S.L. (1990). "Probing immunosuppressant action with nonnatural immunophilin ligand." *Science*, 250, 556-558.
- BIERER, B.E.; HOLLANDER, G.; FRUMAN, D.; BURAKOFF, S.J. (1993). "CsA and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for

transplantation biology." *Curr. Opin. Immunol.*, 5, 763-773.

-BINNS, R.M. (1982). "Organisation of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 3, 95-146.

-BINNS, R.M. (1994). "The null/ $\gamma\delta$ TCR⁺ cell family in the pig." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 43, 69-78.

-BINNS, R.M.; PABST, R. (1994). "Lymphoid tissue structure and lymphocyte trafficking in the pig." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 43, 79-88.

-BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C. (1987). "The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens." *Nature*, 329, 512-517.

-BLACK, D.N.; BROWN, F. (1976). "Purification and physicochemical characteristics of ASFV." *J. Gen. Virol.*, 32, 509-518.

-BLASCO, R.; AGÜERO, M.; ALMENDRAL, J.M.; VIÑUELA, E. (1989). "Variable and constant regions in ASFV DNA." *Virology*, 168, 330-338.

-BLECHA, F.; KIELIAN, T.; McVEY, D.S.; LUNNEY, J.K.; WALKER, K.; *et al.* (1994). "Workshop studies on monoclonal antibodies reactive against porcine myeloid cells." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 43, 269-272.

-BOEHME, S.A.; LENARDO, M.J. (1993). "Proapoptotic apoptosis of mature T lymphocytes occurs at S phase of the cell cycle." *Eur. J. Immunol.*, 23, 1552-1560.

-BOISE, L.H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M.; POSTEMA, C.E.; DING, L.; LINDSTEN, T.; TURKA, L.A.; MAO, X.; NUÑEZ, G.; THOMPSON, C.B. (1993). "Bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." *Cell*, 74, 597-608.

-BONNEFOY-BERARD, N.; GENESTIER, L.; FLACHER, M.; REVILLARD, J.P. (1994). "The phosphoprotein phosphatase calcineurin controls calcium-dependent apoptosis in B cell lines." *Eur. J. Immunol.*, 24, 325-329.

-BOOL, P.H.; ORDAS, A.; SANCHEZ-BOTIJA, C. (1970). "Le diagnostic par immunofluorescence de la Peste Porcine Africaine." *Rvta. Patron. Biol. Anim*, 11, 2, 115-132.

-BOREL, J.F.; FEURER, C.; GUBLER, H.U.; STÄHELIN, H. (1976). "Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent." *Agents Actions*, 6, 648-653.

-BOREL, J.F.; FEURER, C.; MAGNEE, C.; STÄHELIN, H. (1977). "Effects of the

new antilymphocyte peptide CsA in animals." *Immunology*, 32, 1017-1025.

-BORROW, P.; TISHON, A.; OLDSTONE, M.B.A. (1991). "Infection of lymphocytes by a virus that aborts cytotoxic T lymphocyte activity and establishes persistent infection". *J. Exp. Med.*, 174, 203-212.

-BOUSSIOTIS, V.A.; FREEMAN, G.J.; GRIBBEN, J.G.; DALEY, J.; GRAY, J.; NADLER, L.M. (1993). "Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that co-stimulate T-cell activation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 11059-11063.

-BRACIALE, T.J.; MORRISON, L.A.; SWEETSER, M.T.; SAMBROOK, J.; GETHING, M.J.; BRACIALE, V.L. (1987). "Antigen presentation pathways to class I and class II MHC-restricted T lymphocytes." *Immunol. Rev.*, 98, 95-114.

-BRAUTIGAM, A.R.; DUTKO, F.J.; OLDING, L.B.; OLDSTONE, M.B.A. (1979). "Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection: the macrophage as a permissive cell for CMV infection, replication and latency." *J. Gen. Virol.*, 44, 349-359.

-BREESE, S.S.; DeBOER, C.J. (1966). "Electron microscope observations of African Swine Fever virus in tissue culture cells." *Virology*, 28, 420-428.

-BREESE, S.S.; DeBOER, J.; DeBOER, C.J. (1967). "Chemical structure of African Swine Fever Virus investigated by electron microscopy". *J. Gen. Virol.*, 1, 251-252.

-BRETSCHER, P.A.; HAVELE, C. (1992). "Cyclosporin A can switch the immune response induced by antigen from a humoral to a cell-mediated mode." *Eur. J. Immunol.*, 22, 349-355.

-BROWN, F. (1986). "The classification and nomenclature of viruses." International committee of Taxonomy of viruses in Sendai, September, 1984. *Intervirology*, 25, 141-143.

-BROWN, P.J.; BOURNE, F.J. (1976). "Distributions of immunoglobulin-containing cells in alimentary tract, spleen, and mesenteric lymph node of the pig demonstrated by peroxidase-conjugated antisera to porcine immunoglobulins G, A, and M." *Am. J. Vet. Res.*, 37, 1, 9-13.

-BRYSON, J.S.; CAYWOOD, B.E.; KAPLAN, A.M. (1991). "Relationship of cyclosporine A-mediated inhibition of clonal deletion and development syngeneic graft-versus-host disease." *J. Immunol.*, 147, 240-245.

-BULLER, R.M.L.; PALUMBO, G.J. (1993). "Poxvirus Pathogenesis." *Microbiological Reviews*, 55, 1, 80-122.

- BUNJES, D.; HARDT, C.; RÖLLINGHOFF, M.; WAGNER, H. (1981). "Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of IL-1 and IL-2 ". *Eur. J. Immunol.*, 11, 657-661.
- BURGERT, H.G.; KVIST, S. (1985). "An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens." *Cell*, 41, 987-997.
- BUSCHLE, M.; CAMPANA, D.; CARDING, S.R.; RICHARD, C.; HOFFBRAND, A.V.; BRENNER, M.K. (1993). "Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia." *J. Exp. Med.*, 177, 213-218.
- BUSSOLETI, G.; GUGLIOTTA, P. (1983). "Nonspecific staining of mast cells by avidin-biotin peroxidase complex." *J. Histochem. Cytochem.*, 31, 1419-1421.
- BYRNE, J.A.; OLDSTONE, M.B.A. (1986). "Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocitic choriomeningitis virus.VI. Migration and activity *in vivo* in acute and persistent infection." *J. Immunol.*, 136, 698-702.
- CAMPBELL, A.E.; SLATER, J.S. (1994). "Down regulation of MHC-I synthesis by murine cytomegalovirus early gene expression." *J. Virol.*, 68, 1805-1811.
- CAMPBELL, R.D.; MILNER, C.M. (1993). "MHC genes in autoimmunity." *Curr. Op. Immunol.*, 5, 887-893.
- CANALS, A.; ALONSO, F.; TOMILLO, J.; DOMINGUEZ, J. (1992). "Analysis of T lymphocyte subsets proliferating in response to infective and UV-inactivated ASFV." *Vet. Microbiol.*; 33, 117-127.
- CANNON, M.; OPENSHAW, P.; ASKONAS, B. (1988). "Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus." *J. Exp. Med.*, 168, 1163-1168.
- CANTRELL, D.A.; SMITH, K.A. (1984). "The interleukin-2 T-cell system: A new cell growth model." *Science*, 224, 1312-1316.
- CARRASCO, L.; SIERRA, M.A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; QUEZADA, M. (1989). "Lesiones del pulmón de cerdos inoculados experimentalmente con VPPA." *Anaporc*, 76, 41-42.
- CARRASCOSA, A.L.; SANTARÉN, J.F.; VIÑUELA, E. (1982). "Production and titration of ASFV in porcine alveolar macrophages." *J. Vir. Meth.*, 3, 303-310.
- CARRASCOSA, A.L.; SASTRE, I.; GONZÁLEZ, P.; VIÑUELA, E. (1993). "Localization of the ASFV attachment protein p12 in the virus particle by immunoelectron microscopy." *Virology*, 193, 1, 460-465.

- CARRASCOSA, A.L.; del VAL, M.; SANTARÉN, J.F.; VIÑUELA, E. (1985). "Purification and properties of ASFV." *J. Virol.*, 54, 337-344.
- CARRASCOSA, J.L.; CARAZO, J.M.; CARRASCOSA, A.L.; GARCÍA, N.; SANTISTEBAN, A.; VIÑUELA, E. (1984). "General morphology and capsid fine structure of ASFV particles." *Virology*, 132, 160-172.
- CARRASCOSA, J.L.; GONZÁLEZ, P.; CARRASCOSA, A.L.; BARRENO, B.G.; ENJUANES, L.; VIÑUELA, E. (1986). "Localization of structural proteins in ASFV particles by immunoelectron microscopy." *Virology*, 58, 2, 377-384.
- CARRILLO, C.; BORCA, M.V.; AFONSO, C.L.; ONISK, D.V.; ROCK, D.L. (1994). "Long-Term persistent infection of swine monocytes/macrophages with ASFV." *J. Virol.*, 68, 1, 580-583.
- CARSETTI, R.; KOHLER, G.; LAMERS, M. (1993). "A role for immunoglobulin D: interference with tolerance induction." *Eur. J. Immunol.*, 23, 168-178.
- CASAL, I.; ENJUANES, L.; VIÑUELA, E. (1984). "Porcine leukocyte cellular subsets sensitive to ASFV in vitro." *J. Virol.*, 52, 37-46.
- CASALI, P.; RICE, G.P.A.; OLDSTONE, M.B.A. (1984). "Viruses disrupts functions of human lymphocytes. Effects of measles virus and influenza virus on lymphocyte mediated killing and antibody production." *J. Exp. Med.*, 159, 1322-1337.
- CASTAGNOLI, B. (1969). "Diagnosi differenziale clinica ed anatomopatologica fra peste suina africana e classica". *Atti. Soc. Ital. Sci. Vet.*, 23, 955-958.
- CERUNDOLO, V.; ALEXANDER, J.; ANDERSON, K.; LAMB, C.; CRESSWELL, P.; McMICHAEL, A.; GOTCH, F.; TOWNSEND, A. (1990). "Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility complex." *Nature*, 345, 449-452.
- CHAMS, V.; JOUAULT, T.; FENOUILLET, E.; GLUCKMAN, J.C.; KLATZMANN, D. (1988). "Detection of anti-CD4 autoantibodies in the sera of HIV-infected patients using recombinant CD4 soluble molecules." *AIDS*, 2, 353-361.
- CHEN-WOAN, M.; GOLDSCHNEIDER, I. (1991). "Evidence that CsA treatment causes the appearance in rat lymph nodes of T cells having the antigenic phenotypes of cortical thymocytes." *Transplantation*, 51, 661-668.
- CHENEY, R.T.; SPRENT, J. (1991). "Capacity of CsA to induce auto graft-versus host disease." *J. Immunol.*, 147, 391-397.
- CHINSAKCHAI, S.; MOLITOR, T.W. (1992). "Replication and immunosuppressive effects of Pseudorabies Virus on swine peripheral blood mononuclear cells." *Vet.*

Immunol. Immunopathol., 30, 247-260.

-CIRILLO, R.; TRIGGIANA, M.; SIRI, L.; CICCARELLI, A.; PETTIT, G.R.; CONDORELLI, M.; MARONE, G. (1990). "CsA rapidly inhibits mediator release from human basophils presumably by interacting with cyclophilin." J. Immunol., 144, 3891-3897.

-CLARISSA, R.A.D.; KELLER, S.J. (1994). "Cyclosporin A inhibits vaccinia virus replication *in vitro* ." Arch. Virol., 134, 303-319.

-CLARKE, A.R.; PURDIE, C.A.; HARRISON, D.J.; MORRIS, R.G.; BIRD, C.C.; HOOPES, M.L.; WYLLIE, A.H. (1993). "Thymocyte apoptosis induced by p53. Dependent and independent pathways." Nature, 362, 849-852.

-CLIPSTONE, N.A.; CRABTREE, G.R. (1992). "Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation." Nature, 357, 695-697.

-COBBOLD, S.P.; JAYASURIYA, A.; NASH, A.; PROSPERO, T.D.; WALDMANN, H. (1984). "Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets *in vivo*." Nature, 312, 548-551.

-COGGINS, L. (1966). "Growth and certain stability characteristics of ASFV." Am. J. Vet. Res., 27, 1351-1358.

-COGGINS, L. (1974). "African swine fever virus. Pathogenesis". Progr. med. virol, 18, 48-63.

-COGGINS, L.; HEUSCHELE, W.P. (1966). "Use of agar diffusion precipitation test in the diagnosis of ASFV." Am. J. Vet. Res.; 27, 485-488.

-COGGINS, L.; MOULTON, J.E.; COLGROVE, G.S. (1968). "Studies with Hinde attenuated African Swine Fever virus." The Cornell Veterinarian, 58, 4, 526-540.

-COHEN, J.J.; DUKE, R.C. (1984). "Glucocorticoid activation of a calcium dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death." J. Immunol., 132, 38-42.

-COHEN, J.J.; DUKE, R.C.; FADOK, V.A.; SELLINS, K.S. (1992). "Apoptosis and programmed cell death in immunity." Annu. Rev. Immunol., 10, 267-293.

-COLGROVE, G.S. (1968). "Immunofluorescence and inclusion bodies in circulating leukocytes of pigs infected with ASFV." Bull. Epiz. Dis. Afr., 16, 341-343.

-COLGROVE, G.S.; HAELTERMAN, E.D.; COGGINS, L. (1969). "Pathogenesis of ASF in young pigs." Am. J. Vet. Res., 30, 1343-1359.

- COLIGAN, J.E.; KRUISBEK, A.M.; MARGULIES, D.H.; SHEVACH, E.M.; STOBBER, N. (1992). Eds. "Current protocols in immunology." Greene Publishing Associates and Wiley Interscience.
- COLLINS, T.L.; HANHN, W.C.; BIERER, B.E.; BURAKOFF, S.J. (1993). "CD4, CD8 and CD2 in T cell adhesion and signalling." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 184, 223-233.
- COLLINS, T.L.; KASSNER, P.D.; BIERER, B.E.; BURAKOFF, S.J. (1994). "Adhesion receptors in lymphocyte activation." *Curr. Op. Immunol.*, 6, 385-393.
- COPELAND, E.A.; RINEHART, J.J.; LEWIS, M.; MATHES, L.; OLSEN, R.; SAGONE, A. (1983). "The mechanism of retrovirus suppression of human T cell proliferation *in vitro*." *J. Immunol*, 131, 2017-2020.
- COSTA, J.V. (1990). "African Swine Fever Virus." In Darai (ed.), *Molecular Biology of Iridoviruses*. pp. 247-270, Kluwer Academic Publishers, Norwell.
- COWAN, K.M. (1961). "Immunological studies on African Swine Fever Virus. I. Elimination of the procomplement activity of swine serum with formalin." *J. Immunol.*, 86, 4, 465-470.
- CRABTREE, G.R.; CLIPSTONE, N.A. (1994). "Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes." *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 1045-1083.
- CRESSWELL, P. (1994). "Assembly, transport and function of MHC class II molecules." *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 259-294.
- CROFT, M. (1994). "Activation of naive, memory and effector T cells." *Curr. Op. Immunol.*, 6, 431-437.
- CROFT, M.; DUNCAN, D.D.; SWAIN, S.L. (1992). "Response of naive antigen-specific CD4⁺ T cells in vitro: characteristics of antigen presenting cell requirements." *J. Exp. Med.*, 176, 1431-1437.
- DAMSKY, C.H.; SHEFFIELD, J.B.; TUSZYNSKI, G.P.; WARREN, L. (1977). "Is there a role for actin in virus budding?." *J. Cell. Biol.*, 75, 593-605.
- DAVIS, W.C.; MARUSIC, S.; LEWIN, H.A.; SPLITTER, G.A.; PERRYMAN, L.E.; McGUIRE, T.C.; GORHAM, J.R. (1987). "The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 15, 337-376.

- De BOER, C.J. (1962). "Studies to determine neutralizing antibody in sera from animals recovered from ASF and laboratory animals inoculated with ASFV with adjuvants." *Arch. Ges. Virusforsch.*, 20, 164-179.
- De BOER, C.J.; CHANG-PAN, I.; HESS, W.R. (1972). "Immunology of African Swine Fever." *J.A.V.M.A.* 160, 528-532.
- De MAEYER, E.; DE MAEYER-GUIGNARD, J.; VANDEPUTTE, M. (1975). "Inhibition by interferon of delayed-type hypersensitivity in the mouse." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1753-1757.
- DENT, A.L.; MATIS, L.A.; HOOSHMAND, F.; WIDACKI, S.M.; BLUESTONE, J.A.; HEDRICK, S.M. (1990). "Self-reactive $\gamma\delta$ T cells are eliminated in the thymus." *Nature*, 343, 714-719.
- De PEDRO, S. (1992). "Estudio de las interacciones del virus de la peste porcina africana con el sistema de complemento." Tesis Doctoral. Madrid.
- DeTRAY, D.E. (1957). "Persistence of viremia and immunity in African Swine fever." *Am. J. Vet. Res.*, 18, 811-816.
- DeTRAY, D.E. (1963). "African Swine Fever." *Adv. Vet. Sci.*, 8, 299-333.
- DeTRAY, D.E.; SCOTT, R.G. (1957). "Blood changes in swine with African Swine Fever". *J. Vet. Res.*, 18, 484-490.
- DIVE, C.; GREGORY, C.D.; PHIPPS, D.J.; EVANS, D.L.; MILNER, A.E.; WYLLIE, A.H. (1992). "Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry." *Bioch. Biophys. Acta*, 1133, 275-285.
- DIXON, L.K.; BAYLIS, S.A.; VYDELINGUM, S.; TWIG, S.R.; HAMMOND, J.M.; HINGAMP, M.P.; BRISTOW, C.; WILKINSON, P.J.; SMITH, G.L. (1993). "African Swine Fever virus genome content and variability." *Arch. Virol.*, suppl., 7, 185-199.
- DOGAN, A.; MacDONALD, T.T.; SPENCER, J.O. (1993). "CsA enhances T cell-mediated induction of E-selectin." *Eur. J. Immunol.*, 23, 2922-2926.
- DOHERTY, P.C. (1985). "T cells and viral infections." *British Med. Bull.*, 41, 1, 7-14.
- DOHERTY, P.C.; ALLAN, J.E.; LYNCH, F.; CEREDIG, R. (1990). "Dissection of an inflammatory process induced by CD8⁺ T cells." *Immunol. today*, 11, 2, 55-59.
- DOMANICO, S.Z.; PIERCE, S.K. (1992). "Virus infection blocks the processing

and presentation of exogenous antigen with the major histocompatibility complex class II molecules." *Eur. J. Immunol.*, 22, 2055-2062.

-DORF, M.E.; KUCHROO, V.K.; COLLINS, M. (1992). "Suppressor T cells: some answers but more questions." *Immunol. Today*, 13, 241-243.

-DOYMAZ, M.Z.; ROUSE, B.T. (1992). "Immunopathology of Herpes Simplex virus infection." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 179, 121-133.

-DRANSFIELD, I.; BUCKLE, A.M.; HOGG, N. (1990). "Early events in the immune response mediated by leukocyte integrins." *Immunol. Rev.*, 114, 29-44.

-DUTZ, J.P.; FRUMAN, D.A.; BURAKOFF, S.J.; BIERER, B.E. (1993). "A role for calcineurin in degranulation of murine cytotoxic T lymphocytes." *J. Immunol.*, 150, 2591-2598.

-DYALINAS, D.P.; QUANN, Z.S.; WALL, K.A.; PIERRES, A.; QUINTANA, J.; LOKEN, M.R.; PIERRES, M.; FITCH, F.W. (1983). "Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule." *J. Immunol.*, 131, 2445.

-EDWARDS, J.F.; DODDS, W.J. (1985). "Platelet and fibrinogen kinetics in healthy and african swine fever-affected swine: [⁷⁵Se]Selenomethionine labeling study". *Am. J. Vet. Res.*, 46, 181-184.

-EDWARDS, J.F.; DODDS, W.J.; SLAUSON, D.O. (1984). "Coagulation changes in ASF infection." *Am. J. Vet. Res.*, 45, 2414-2420.

-EDWARDS, J.F.; DODDS, J.W.; SLAUSON, D.O. (1985). "Megakaryocytic infection and thrombocytopenia in ASF." *Vet. Pathol.*, 22, 171-176.

-EDWARDS, J.F.; DODDS, W.J.; SLAUSON, D.O. (1985a). "Mechanism of thrombocytopenia in ASF." *Am. J. Vet. Res.*, 46, 2058-2063.

-EMERY, D.L.; PURI, N.K.; DUFTY, J.H.; GORRELL, M.D.; BRANDON, M.R. (1987). "A functional and biochemical analysis of bovine class II MHC antigens using monoclonal antibodies." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 16, 215-234.

-EMESON, E.E.; ROBERTSON, A.L. (1988). "T lymphocytes in aortic and coronary intimas: their potential role in atherogenesis." *Am. J. Pathol.*, 130, 369-375.

-EMMEL, E.A.; VERWEIJ, C.L.; DURAND, D.B.; HIGGINS, K.M.; LACY, E.; CRABTREE, G.R. (1989). "Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation." *Science*, 246, 1617-1620.

- ENJUANES, L.; CARRASCOSA, A.L.; VIÑUELA, E. (1976). "Isolation and properties of the DNA of ASFV." *J. Gen. Virol.*, 32, 479-492.
- ENJUANES, L.; CARRASCOSA, A.L.; MORENO, M.A.; VIÑUELA, E. (1976a). "Titration of African Swine Fever virus." *J. Gen. Virol.*, 32, 471-477.
- ESCRIBANO, J.M.; TABARÉS, E. (1987). "Proteins specified by ASFV: V-Identification of immediate early, early and late proteins." *Arch. Virol.*, 92, 221-232.
- ESCRIBANO, J.M.; PASTOR, M.J.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. (1989). "Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: Implication for false positive reactions in the serodiagnosis of ASF." *Am. J. Vet. Res.*, 50, 1118-1122.
- ESOLEN, L.M.; WARD, B.J.; MOENCH, T.R.; GRIFFIN, D.E. (1993). "Infection of monocytes during measles." *J. Infect. Dis.*, 168, 47-52.
- ESPARZA, I.; GONZÁLEZ, J.C.; VIÑUELA, E. (1988). "Effect of IFN-alfa, IFN-gamma and TNF on ASFV replication in porcine monocytes and macrophages". *J. Gen. Virol.*, 69, 2973-2980.
- ESSER, R.; BRIESEN, H. von; BRUGGER, W.; CESKA, M.; GLIENKE, W.; MÜLLER, S.; REHM, A.; RÜBSAMEN-WAIGMANN, H.; ANDREESSEN, R. (1991). "Secretory repertoire of HIV-infected human monocytes/macrophages." *Pathobiology*, 59, 219-222.
- ESTEVEZ, A.; MARQUES, M.I.; COSTA, J.V. (1986). "Two-dimensional analysis of African Swine Fever Virus proteins and protein induced in infected cells." *Virology*, 152, 192-206.
- FERGUSON, C.J.; VON RUHLAND, C.; PARRY-JONES, D.J.; GRIFFITHS, D.F.; SALAMAN, J.R.; WILLIAMS, J.D. (1993). "Low dose CsA nephrotoxicity in the rat." *Nephrol. Dial. Transplant.*, 8, 1259-1263.
- FERNÁNDEZ, A.; PÉREZ, J.; CARRASCO, L.; BAUTISTA, M.J.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.; SIERRA, M.A. (1992). "Distribution of ASFV antigens in pig tissues experimentally infected with two different Spanish virus isolates." *J. Vet. Med. B*, 39, 393-402.
- FERNÁNDEZ, A.; PÉREZ, J.; MARTÍN DE LAS MULAS, J.; CARRASCO, L.; DOMÍNGUEZ, J.; SIERRA, M.A. (1992a). "Localization of ASFV antigen, swine IgM, IgG and C1q in lung and liver tissues of experimentally infected pigs." *J. Comp. Path.*, 107, 81-90.
- FERNÁNDEZ, A.; PÉREZ, J.; CARRASCO, L.; SIERRA, M.A.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.; JOVER, A. (1992b). "Detection of ASF viral antigens in paraffin-embedded

tissues by use of immunohistologic methods and polyclonal antibodies." Am. J. Vet. Res., 53, 1462-1467.

-FERNES, G.; REIDY, M.A.; ROSS, R. (1990). "Vascular effects of CsA *in vivo* and *in vitro*." Am. J. Pathol., 137, 403-407.

-FITCH, F.W.; McKISIC, M.D.; LANCKI, D.W.; GAJEWSKI, T.F. (1993). "Differential regulation of murine lymphocyte subsets." Annu. Rev. Immunol., 11, 29-48.

-FLANAGAN, W.M.; CORTHESEY, B.; BRAM, R.J.; CRABTREE, G.R. (1991). "Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK506 and CsA." Nature, 352, 803-807.

-FLUCKIGER, A.C.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J. (1994). "IL-10 induces apoptosis cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells." J. Exp. Med., 179, 91-99.

-FOLKS, T.M.; KESSLER, S.W.; ORENSTEIN, J.M.; JUSTEMENT, J.S.; JAFFE, E.S.; FAUCI, A.S. (1988). "Infection and replication of HIV-1 in purified progenitor cells of normal bone marrow." Science, 242, 919-922.

-FORMAN, A.J.; WARDLEY, R.C.; WILKINSON, P.J. (1982). "The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of ASFV." Arch. Virol., 74, 91-100.

-FORMAN, A.J.; WARDLEY, R.C.; NORLEY, S.G. (1983). "Interactions of porcine alveolar macrophages and bone marrow cells with ASFV and virus infected cells." Vet. Microbiol., 8, 163-177.

-FOSSUM, C; BURNY, A; PORTETELLE, D; MAMMERICKX, M; MOREIN, B. (1988). "Detection of B and T cells, with lectins or antibodies, in healthy and bovine leukemia virus infected cattle". Vet. Immunol. Immunopathol., 18, 269-278.

-FRIEDMAN, J.; WEISSMAN, I. (1991). "Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA." Cell, 66, 799-806.

-FRUMAN, D.A.; BURAKOFF, S.J.; BIERER, B.E. (1992). "Correlation of calcineurin phosphatase activity and programmed cell death in T cell hybridomas." Eur. J. Immunol., 22, 2513-2517.

-FRUMAN, D.A.; KLEE, C.B.; BIERER, B.E.; BURAKOFF, S.J. (1992a). "Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and CsA." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3686-3690.

-FUKUZAWA, M.; SHEARER, G.M. (1989). "Effect of CsA on T cell immunity I.

Dose-dependent suppression of different murine T helper pathways." Eur. J. Immunol., 19, 49-56.

-FUKUZAWA, M.; OKADA, A.; SHEARER, G.M. (1991). "Effect of FK506 on CD4⁺ and CD8⁺ T-cell function *in vivo*." Transplant. Proc., 23, 2945-2947.

-FURUE, M.; KATZ, S.I.; KAWAKAMI, Y.; KAWAKAMI, T. (1993). "Coordinate expression of src family protooncogenes in T cell activation and its modulation by CsA." J. Immunol., 144, 736-741.

-GALLAGHER, R.B.; BRINES, R.; GIRDLESTONE, D. (1993). "Why immunopharmacology?." Immunol. Today, 14, 241.

-GALO, A.; NUNES-PETISCA, J.L. (1990). "Cellular localization os ASFV nucleic acid, using *in situ* hibridization in paraffin embedded tissus sections." Rev. Portug. Cienc. Vet., 85, 493-494.

-GARCÍA-BARRENO, B.; SANZ, A.; NOGAL, M.L.; VIÑUELA, E.; ENJUANES, L. (1986). "Monoclonal antibodies of ASFV: antigenic differences among field virus isolates and viruses passaged in cell culture." J. Virol., 58, 385-392.

-GARCÍA-GANCEDO, A.; RUBIO-HUERTOS, M.; RONDA-LAÍN, E. (1974). "Ultraestructura de bazo e hígado de cerdo infectado con peste porcina africana." Microbiol, 27, 177-189.

-GARTNER, S.; MARKOVITS, P.; MARKOVITZ, D.M.; KAPLAN, M.H.; GALLO, R.C.; POPOVIC, M. (1986). "The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection." Science, 233, 215-219.

-GATEI, M.H.; BRANDON, R.B.; NAIF, H.M.; McLENNAN, M.W.; DANIEL, R.C.W.; LAVIN, M.F. (1989). "Changes in B cell and T cell subsets in Bovine Leukaemia Virus-infected cattle". Vet. Immunol. Immunopathol., 23, 139-147.

-GEERING, G.; ENDRIS, R.G.; HASLETT, T.M.; DOROSKI, P.L.; HESS, W.R. (1986). "Identification of ASF viral antigens in the hemolymph of soft ticks (Argasidae: *Ornithodoros*) by the immunodot blot test." Am. J. Trop. Med. Hyg., 35, 5, 1027-1034.

-GEIGER, W. (1937). "Hog cholera and African swine fever." Thesis, Hannover.

-GENOVESI, E.V.; KNUDSEN, R.C.; WHYARD, T.C.; MEBUS, C.A. (1988). "Moderately virulent ASFV infection: Blood cell changes and infective virus distribution among blood components". Am. J. Vet. Res., 49, 3, 338-344.

-GERMAIN, R.N. (1994). "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." Cell, 76, 287-299.

- GODFREY, M.P.; PHILLIPS, M.E.; ASKENASE, P.W. (1983). "Histopathology of delayed-onset hypersensitivities in contact-sensitive guinea-pigs." *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 70, 50-58.
- GOLD, R.; SCHMIED, M.; GIEGERICH, G.; BREITSCHOPF, H.; HARTUNG, H.P.; TOYKA, K.V.; LASSMAN, H. (1994). "Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques." *Lab. investigation.*, 71, 219-225.
- GOLSTEIN, P.; OJCIUS, D.M.; YOUNG, D.E. (1991). "Cell death mechanisms and the immune system." *Immunol. Revs.*, 121, 29-65.
- GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; HERVÁS, J.; MÉNDEZ, A.; CARRASCO, L.; VILLEDA, C.; JOVER, A. (1994). "Estudio ultraestructural de los capilares del riñón de cerdos inoculados con una cepa altamente virulenta del virus de la PPA (Malawi '83). VI reunión nacional de la SEAPV. Murcia.
- GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; SIERRA, M.A.; MOZOS, E.; BERNABÉ, A. (1989). "Lesiones del hígado de cerdo en la peste porcina africana experimental" *Anaporc*, 76, 38-40.
- GONZÁLEZ, A.; CALVO, V.; ALMAZÁN, F.; ALMENDRAL, J.M.; RAMÍREZ, J.C.; de la VEGA, I.; BLASCO, R.; VIÑUELA, E. (1993). "Multigene families in ASFV: family 360." *J. Virol.*, 64, 2073-2081.
- GONZÁLEZ, S.; MENDOZA, C.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.; ALONSO, F. (1990). "Inhibitory effect of ASFV on lectin-dependent swine lymphocyte proliferation." *Vet. Immunol., Immunopath.*, 26, 71-80.
- GONZÁLEZ-JUARRERO, M.; LUNNEY, J.K.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.; MEBUS, C. (1992). "Modulation of splenic macrophages, and swine leukocyte antigen (SLA) and viral antigen expression following ASFV inoculation." *Arch. Virol.*, 123, 145-156.
- GONZÁLEZ-JUARRERO, M.; MEBUS, C.A.; PAN, R.; REVILLA, Y.; ALONSO, J.M.; LUNNEY, J.K. (1992a). "Swine leukocyte antigen and macrophage marker expression on both ASFV-infected and non infected primary porcine macrophage cultures." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 32, 243-259.
- GOODING, L.R. (1992). "Virus proteins that counteract the host immune defenses." *Cell*, 71, 5-7.
- GOORHA, R.; GRANOFF, A. (1979). "Icosaedral cytoplasmic deoxyriboviruses." Chapter 6, *Comprehensive Virology*, 14, 347-399.
- GOUDSMIT, J.; LJUNGGREN, K.; SMIT, L.; JORDAN, M.; FEUYÖ, E.M. (1988).

"Biological significance of the antibody response to HIV antigens expressed on the cell surface." Arch. Virol., 103, 189-206.

-GOUGEON, M.L.; LAURENT-CRAWFORD, A.G.; HOVANESSIAN, A.G.; MONTAGNIER, L. (1993). "Direct and indirect mechanisms mediating apoptosis during HIV infection: contribution to *in vivo* CD4 T cell depletion." Sem. Immunol., 5, 187-194.

-GRANELLI-PIPERNO, A.; ANDRUS, L.; STEINMAN, R.M. (1986). "Lymphokine and nonlymphokine mRNA levels in stimulated human T cells. Kinetics, mitogen requirements and effects of CsA." J. Exp. Med., 163, 922-937.

-GRAY, D. (1994). "Regulation of immunological memory." Curr. Op. Immunol., 425-430.

-GRAY, D.; KOSCO, M.; STOCKINGER, B. (1991). "Novel pathways of antigen presentation for the maintenance of memory." Int. Immunol., 3, 141-148.

-GREEN, D.R.; FLOOD, P.M.; GERSHON, R.K. (1983). "Immunoregulatory T-cell pathways." Ann. Rev. Immunol., 1, 439-463.

-GREEN, D.R.; SCOTT, D.W. (1994). "Activation-induced apoptosis in lymphocytes." Curr. Op. Immunol., 6, 476-487.

-GREGORY, C.D.; DIVE, C.; HENDERSON, S.; SMITH, C.A.; WILLIAMS, G.T.; GORDON, J.; RICKINSON, A.B. (1991). "Activation of Epstein-Barr virus latent-genes protects human B cells from death by apoptosis." Nature, 349, 612-614.

-GREIG, A. (1972). "Pathogenesis of ASF in pigs naturally exposed to the disease." J. Comp. Pathol., 82, 73-79.

-GRIFFITHS, E.J.; HALESTRAP, A.P. (1991). "Further evidence that CsA protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. Implications for the immunosuppressive and toxic effects of CsA." Biochem. J., 274, 611-614.

-GROGG, D.; HAHN, S.; ERB, P. (1992). "CD4⁺ T cell-mediated killing of major histocompatibility complex class II-positive antigen-presenting cells (APC) III. CD4⁺ cytotoxic cells induce apoptosis of APC." Eur. J. Immunol., 22, 267-272.

-GROUX, H.; TORPIER, D.; MONTÉ, D.; MOUTON, Y.; CAPRON, A.; AMEISEN, J.C. (1992). "Activation-induced death by apoptosis in CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals." J. Exp. Med., 175, 331-340.

-GRUNDY, J.E.; DOWNES, K.L. (1993). "Up-regulation of LFA-3 and ICAM-1 on

the surface of fibroblasts infected with cytomegalovirus." Immunology, 78, 405-412.

-HAAS, W.; PEREIRA, P.; TONEGAWA, S. (1993). " $\gamma\delta$ cells." Ann. Rev. Immunol., 11, 637-685.

-HAASE, A.T. (1986). "Pathogenesis of lentivirus infections." Nature, 322, 130-136.

-HAINES, D.M.; CHELACK, B.J. (1991). "Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology." J. Vet. Diagn. Invest., 3, 101-112.

-HAMDY, F.M.; COLGROVE, G.S.; deRODRÍGUEZ, E.M. (1981). "Field evaluation of ELISA for detection of antibody to African Swine Fever virus." Am. J. Vet. Res., 42, 1441-1443.

-HAMDY, F.M.; DARDIRI, A.H. (1984). "Clinical and immunologic responses of pigs to African Swine Fever virus isolated from the western hemisphere". Am. J. Vet. Res., 45, 4, 711-714.

-HAMMERBERG, C.; SCHURIG, G.G. (1986). "Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes." Vet. Immunol. Immunopathol., 11, 107-121.

-HANDSCHUMACHER, R.E.; HARDING, M.W.; RICE, J.; DRUGGE, R.J.; SPEICHER, D.W. (1984). "Cyclophilin. A specific cytosolic binding protein for CsA." Science, 226, 544-547.

-HAVRAN, W.L.; BOISMENU, R. (1994). "Activation and function of $\gamma\delta$ T cells." Curr. Op. Immunol., 6, 442-446.

-HAYWOOD, A.M. (1986). "Patterns of persistent viral infections." New Engl. J. Med., 315, 15, 939-947.

-HENSON, J.B.; LENDER, R.W.; GORHAN, J.R. (1961). "Hypergammaglobulinemia in mink." Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 107, 919-920.

-HERVÁS, J.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; PÉREZ, J.; CARRASCO, L.;
C H A C Ó N
M. DE LARA, F.; MARTÍN DE LAS MULAS, J. (1994). "Replicación *in vivo* de virus de la PPA altamente virulento (Malawi '83) en fibroblastos y fibras musculares lisas: estudio inmunocitoquímico y ultraestructural." VI reunión nacional de la SEAPV. Murcia.

-HESS, W.R. (1971). "African Swine Fever Virus." Virol. Monogr., 9, 1-27.

- HESS, W.R. (1981). "African Swine Fever: A reassessment." *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 25, 36-69.
- HESS, W.R.; DeTRAY, D.E. (1961). "The use of leukocyte cultures for diagnosing ASF." *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 55, 201-204.
- HESS, W.R.; PAN, I.C. (1977). "The immune response in African swine fever". *Comission of the European Communities*, 602-612, EUR 5904, Ed. B. Liess.
- HESS, W.R.; COX, B.F.; HEUSCHELE, W.P.; STONE, S.S. (1965). " Propagation and modification of African Swine Fever virus in cell cultures." *Am. J. Vet. Res.*, 26, 141-146.
- HESS, W.R.; ENDRIS, R.G.; HASLETT, T.M.; MONAHAN, M.J.; McCOY, J.P. (1987). "Potential arthropod vectors of ASFV in North America and the Caribbean Basin." *Vet. Parasit.*, 26, 145-155.
- HEUSEL, J.W.; WESSELSCHMIDT, R.L.; SHRESTA, S.; RUSSELL, J.H.; LEY, T.J. (1994). "Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells." *Cell*, 76, 977-987.
- HEUSCHELE, W.P.; COGGINS, L. (1965). "Isolation of ASFV from a giant forest hog." *Bull. Epiz. Dis. Afr.*, 13, 255-256.
- HEUSCHELE, W.P.; COGGINS, L.; STONE, S.S. (1966). "Fluorescent antibody studies on African swine fever virus." *Am. J. Vet. Res.*, 27, 117, 477-484.
- HIRAOKA, Y.; KISHIMOTO, C.; KUROKAWA, M.; OCHIAI, H.; SASAYAMA, S. (1992). "The effects of FK-506, a novel and potent immunosuppressant, upon murine Cosackievirus B3 myocarditis." *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 260, 1386-1391.
- HO, D.D.; ROTA, T.R.; HIRSCH, M.S. (1986). "Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III." *J. Clin. Invest.*, 77, 1712-1715.
- HOFFMANN-FEZER, G; THUM, J; ACKLEY, C; HEUSCHELE, W.P.; MYSLIWETZ, J; THEFELD, S; HARTMANN, K; KRAFT, W. (1992). "Decline in CD4⁺ cell numbers in cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection". *J. Virol.*, 66, 1484-1488.
- HOM, R.C.; FINBERG, R.W.; MULLANEY, S.; RUPRECHT, R.M. (1991). "Protective cellular retroviral immunity requires both CD4⁺ and CD8⁺ immune T cells." *J. Virol.*, 65, 220-224.
- HORTIGÜELA, O.; SÁNCHEZ-VIZCAINO, J.M.; ARIAS, M. (1993). "Quantitation of the antibody response in ASFV infection. I: Adaptation of an

enzymeimmunoassay using monoclonal antibodies against different isotypes of immunoglobulin." Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim., 8, 289-298.

-HOU, S.; FISHMAN, M.; MURTI, K.G.; DOHERTY, P.C. (1993). "Divergence between cytotoxic effector function and TNF- α production for inflammatory CD4⁺ T cells from mice with Sendai virus pneumonia." J. Virol., 67, 6299-6302.

-HUEGIN, A.W.; CERNY, A.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. (1985). "Suppression by cyclosporin A of murine T cell-mediated immunity against viruses *in vivo* and *in vitro*." Cell. Immunol., 90, 464-473.

-ISEKI, R.; MUKAY, M.; IWATA, M. (1991). "Regulation of T lymphocyte apoptosis. Signals for the antagonism between activation and glucocorticoid induced death." J. Immunol., 149, 3302-3308.

-ITOH, N.; YONEHARA, S.; ISHII, A.; YONEHARA, M.; MIZUSHIMA, S.I.; MASAZUMI, S.; HASE, A.; SETO, Y.; NAGATA, S. (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis." Cell, 66, 233-243.

-JACOBS, R.P.; COLE, G.A. (1976). " LCMV-induced immunosuppression: a virus induce macrophage defect ". J. Immunol., 117, 1004-1009.

-JAKAB, G.J.; GREEN, G.M. (1976). "Defect in intracellular killing of *Staphylococcus aureus* within alveolar macrophages in Sendai virus-infected murine lungs." J. Clin. Invest., 57, 1533-1539.

-JAKAB, G.J.; WARR, G.A. (1981). "Immune-enhanced phagocytic dysfunction in pulmonary macrophages infected with parainfluenza I (Sendai) virus." Am. Rev. Resp. Dis., 124, 575-581.

-JANEWAY, C.A. Jr.; BOTTOMLY, K. (1994). "Signals and signs for lymphocyte responses." Cell, 76, 275-285.

-JANEWAY, C.A.; JONES, B.; HAYDAY, A. (1988). " Specificity and function of T cells bearing $\gamma\delta$ receptors ". Immunology today, 9, 3, 73-76.

-JOAG, S.V.; NARAYAN, O. (1993). "Immunodeficiency-inducing retroviruses." Curr. Op. Immunol., 5, 595-599.

-JOHNSON, H.M.; SMITH, B.S.; BARON, S. (1975). "Inhibition of the primary *in vitro* antibody response by interferon preparations." J. Immunol., 114, 403-409.

-JONASSON, L.; HOLM, J.; HANSSON, G.K. (1988). "CsA inhibits smooth muscle proliferation in the vascular response to injury." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2303-2306.

- JONASSON, L.; HOLM, J.; SKALL, O.; BONDJERS, G.; HANSSON, G. (1988a). "Regional accumulation of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque." *Arteriosclerosis*, 6, 131-135.
- JONES, R.J.; HESS, A.D.; MANN, R.B.; PIANTADOSI, S.; VOGELSANG, G.B.; FARMER, E.R.; GELLER, R.B.; SANTOS, G.W. (1989). "Induction of graft-versus-host disease after autologous bone marrow transplantation." *Lancet*, 1, 754-757.
- JONJIC, N.; JONJIC, S.; SAALMÜLLER, A.; RUKAVINA, D.; KOSZINOWSKI, U.H. (1987). "Distribution of T-lymphocyte subsets in porcine lymphoid tissues." *Immunology*, 60, 395-401.
- JUNE, C.H.; LEDBETTER, J.A.; GILLESPIE, M.M.; LINDSTEN, T.; THOMPSON, C.B. (1987). "T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with CsA-resistant IL-2 gene expression." *Mol. Cell. Biol.*, 7, 4472-4481.
- JUNE, C.H.; LEDBETTER, J.A.; LINSLEY, P.S.; THOMPSON, C.B. (1990). "Role of the CD28 receptor in T cell activation." *Immunol. Today*, 11, 211-216.
- KABELITZ, D.; PECHHOLD, K.; BENDER, A.; WESSELBORG, S.; WESCH, D.; FRIESE, K.; JANSSEN, O. (1991). "Activation and activation driven death of human γ/δ T cells." *Immunol. Revs.*, 120, 71-88.
- KÄGI, D.; LEDERMAN, B.; BÜRKL, K.; SELLER, P.; ODERMATT, B.; OLSEN, K.J.; PODACK, E.R.; ZINKERNAGEL, R.M.; HENGARTNER, H. (1994). "Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin deficient mice." *Nature*, 369, 31-37.
- KAHAN, B.D. (1989). "Drug therapy, cyclosporine." *N. Engl. J. Med.*, 321, 1725-1738.
- KAN, O.; BALDWIN, S.A.; WHETTON, A.D. (1994). "Apoptosis is regulated by the rate of glucose transport in an IL-3 dependent cell line." *J. Exp. Med.*, 180, 917-923.
- KANARIOU, M.; HUBY, R.; LADYMAN, H.; COLIC, M.; SIVOLAPENKO, I.; LAMPERT, I.; RITTER, M. (1989). "Immunosuppression with CsA alters the thymic microenvironment." *Clin. Exp. Immunol.*, 78, 263-270.
- KANNO, H.; WOLFINBARGER, J.B.; BLOOM, M.E. (1993). "Aleutian mink disease parvovirus infection of mink macrophages and human macrophage cell line U937: Demonstration of antibody dependent enhancement of infection." *J. Virol.*, 67, 7017-7024.
- KANTOR, A.B.; HERZENBERG, L.A. (1993). "Origin of murine B cell lineages." *Ann. Rev. Immunol.*, 11, 501-538.

- KASAIAN, M.T.; BIRON, C.A. (1990). "CsA inhibition of IL-2 gene expression, but not natural killer cell proliferation, after IFN induction *in vivo*." J. Exp. Med., 171, 745-762.
- KASTRUKOFF, L.F.; LAU, A.S.; LEUNG, G.Y.; THOMAS, E.E. (1993). "Contrasting effects of immunosuppression on herpes simplex virus type I (HSV I) induced central nervous system (CNS) demyelination in mice." J. Neurol. Sci., 117, 148-158.
- KAUFFMAN, R.S.; FIELDS, B.N. (1985). "Pathogenesis of viral infections." In Virology, Ed. Fields, B.N. *et al.*, Raven Press. New York.
- KELSOE, G.; ZHENG, B. (1993). "Sites of B-cell activation." Curr. Op. Immunol., 5, 418-422.
- KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br. J. Cancer, 26, 239.
- KING, C.C.; DE FRIES, R.; KOLHEKAR, S.R.; AHMED, R. (1990). "*In vivo* selection of lymphocyte-tropic and macrophage-tropic variants of lymphocytic choriomeningitis virus during persistent infection." J. Virol., 5611-5616.
- KING, L.B.; ASHWELL, J.D. (1993). "Signaling for death of lymphoid cells." Curr. Op. Immunol., 5, 368-373.
- KLARNET, J.P.; KERN, D.E.; OKUNO, K.; HOLT, C.; LILLY, F.; GREENBERG, P.D. (1989). "FBL-reactive CD8⁺ cytotoxic and CD4⁺ helper T lymphocytes recognize distinct Friend murine leukemia virus-encoded antigens." J. Exp. Med., 169, 457-467.
- KLAUS, G. (1988). "CsA sensitive and CsA insensitive modes of B cell stimulation." Transplantation, 46, 115-145.
- KLEINERMAN, E.S.; SNYDERMAN, R.; DANIELS, C.A. (1974). "Depression of human monocyte chemotaxis by herpes simplex and influenza viruses." J. Immunol., 113, 1562-1567.
- KNAPP, W.; DORKEN, B.; GILKS, W.R. *et al*, eds. (1990). "Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens." Oxford University Press, 1990.
- KNIGHT, C.R.L.; REES, R.C.; PALTTS, A.; JOHNSON, T.; GRIFFIN, M. (1993). "IL-2 activated human effector lymphocytes mediate cytotoxicity by inducing apoptosis in human leukaemia and solid tumor target cells." Immunology, 79, 535-541.

- KNUDSEN, R.C.; GENOVESI, E.V.(1987). "In vivo and in vitro effects of moderately virulent african swine fever virus on mitogenesis of pig lymphocytes" Veterinary immunology and immunopathology, 15, 323-336.
- KNUDSEN, R.C.; GENOVESI, E.V.; WHYARD, T.C.; WOOL, S.H. (1987a) "Cytopathogenic effect of ASFV for pig monocytes: Characterization and use of microassay." Vet. Microbiol., 14, 15-24.
- KONKE, M.; LEONARD, W.J.; DEPPER, J.M.; ARYA, S.K.; WONG-STAAAL, F.; GALLO, R.C.; WALDMAN, T.A.; GREENE, W.C. (1984). "CsA inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5214-5218.
- KONNO, S.; TAYLOR, W.D.; DARDIRI, A.H. (1969). "Acute African Swine Fever proliferative phase in lymphoreticular tissue and the reticuloendothelial system." Cornell Vet., 59, 71-84.
- KONNO, S.; TAYLOR, W.D.; HESS, W.R.; HEUSCHELE, W.P. (1972). "Spleen pathology in African Swine Fever". Cornell Vet., 62, 486-506.
- KÖRNER, H.; BURGERT, H.G. (1994). "Down-regulation of HLA antigens by the adenovirus type 2 E3/19k protein in a T-Lymphoma cell line." J. Virol., 68, 1442-1448.
- KOSAKA, H.; MATSUBARA, H.; SOGOH, S.; OGATA, M.; HAMAOKA, T.; FUJIWARA, H. (1990). "An *in vitro* model for CsA induced interference of intrathymic clonal elimination." J. Exp. Med., 172, 395-398.
- KOSUGI, A.; SHEARER, G.M. (1991). "Effect of CsA on lymphopoiesis III. Augmentation of the generation of NK cells in bone marrow transplanted mice healed with CsA." J. Immunol., 146, 1416-1421.
- KOSZINOWSKI, U.; ERTL, H.; WEKERLE, J.; THOMSEN, R. (1976). "Recognition of alteration induced by early vaccinia surface and dependence of viral specific lysis on H-2 antigen concentration on target cells." Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 41, 529-537.
- KROUP, R.A. (1994). "Virus escape from CTL recognition." J. Exp. Med., 180, 779-782.
- KOVALENKO, J.R.; SIDOROV, M.A.; BURBA, L.J. (1965). "Experimental investigations on African Swine Fever." Off. Intl. Epizoot. Bull, 63, 169-189.
- KOZIEL, M.J.; DUDLEY, D.; AFDHAL, N.; CHOO, Q-L.; HOUGHTON, M.; RALSTON, R.; WALKER, B.D. (1993). "Hepatitis C virus (HCV)-specific CTLs recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV." J. Virol., 67, 12,

7522-7532.

-KREMER, W.D.J.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N.; HENRICKS, P.A.J.; VAN DER VLIET, H. (1992). "A procedure for parallel isolation of white blood cells, granulocyte and purified neutrophil suspensions from the peripheral blood of cattle." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 31, 189-193.

-KRISHAN, A. (1975). "Rapid flow cytometric analysis of mamalian cell cycle by propidium iodide staining." *J. Cell. Biol.*, 66, 188-193.

-KUZNAR, J.; SALAS, M.L.; VIÑUELA, E. (1981). "Nucleotide triphosphate phosphohydrolase activities in African Swine Fever virus." *Arch. Virol.*, 96, 307-320.

-LANZAVECCHIA, A. (1985). "Antigen specific interaction between T and B cells". *Nature*, 314, 537-539.

-LANZAVECCHIA, A. (1986). "Antigen presentation by B-lymphocytes: a critical step in T-B collaboration". *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 130, 65-77.

-LANZAVECCHIA, A.; ROOSNEK, E.; GREGORY, T.; BERMAN, P.; ABRIGNANI, S. (1988). "T cells can present antigens such as HIV gp120 targeted to their own surface molecules." *Nature*, 334, 530-532.

-LAURENT-CRAWFORD, A.G.; KRUST, B.; MULLER, S.; RIVIERE, Y.; REY-CUILLE, M.A.; BECHET, J.M.; MONTAGNIER, L.; HOVANESSIAN, A. (1991). "The cytophatic effect of HIV is associated with apoptosis". *Virology*, 185, 829-839.

-LAUTENSCHLAGER, I.; HOCKERSTEDT, K.; MÄKISALO, H.; ORKO, R.; TASKINEN, E. (1991). "Efficiency of FK506 and CsA to prevent acute cellular rejection of pig liver allografts." *Transpl. Proceedings*, 23, 2233-2235.

-LAWMAN, M.J.P.; MARTINS, C.V.; MEBUS, C.A.; LUNNEY, J. (1987). "Modulation of porcine peripheral blood-derived macrophage function by in vitro infection with ASFV isolates of different virulence." *African Swine Fever and Pig Immunology*. Salamanca. Noviembre.

-LEAPMAN, S.B.; FILO, R.S.; SMITH, E.J.; SMITH, P.G. (1980). "*In vitro* effects of CsA on lymphocyte subpopulations." *Transplantation*, 30, 6, 404-408.

-LEDBETTER, J.A.; EVANS, R.L.; LIPINSKI, M.; CUNNINGHAM-RUNDLES, R.A.; HERZENBERG, L.A. (1981). "Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulation in mouse and man." *J. Exp. Med.*, 153, 310-315..

-LEDERMAN, S.; YELLIN, M.J.; KRICHEVSKY, A.; BELKO, J.; LEE, J.J.; CHESS,

- L. (1992). "Identification of a novel surface protein on activated CD4⁺ T cells that induces contact dependent B cell differentiation (help)." *J. Exp. Med.*, 175, 1091-1101.
- LEE, M.A.; YATES, J.L. (1992). "BHRF1 of Epstein-Barr virus, which is homologous to human proto-oncogen bcl2, is not essential for transformation of B cells or for virus replication *in vitro*." *J. Virol.*, 66, 1899-1906.
- LEHMAN, P.V.; SERCARZ, E.E.; FORSTLUBER, T.; DAYAN, C.M.; GAMMON, G. (1993). "Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire." *Immunol. Today*, 14, 203-208, 1993.
- LEIST, T.P.; COBBOLD, S.P.; WALDMANN, H.; AGUET, M.; ZINKERNAGEL, R.M. (1987). "Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense." *J. Immunol.*, 138, 2278-2281.
- LEIST, T.P.; RUEDI, E.; ZINKERNAGEL, R.M. (1988). "Virus-triggered immune suppression in mice caused by virus-specific cytotoxic T cells". *J. Exp. Med.*, 167, 1749-1754.
- LENARDO, M.J. (1991). "IL-2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis." *Nature*, 353, 859-861.
- LESZCZYNSKY, D.; ZHAO, Y.; YEAGLEY, T.J.; FOEGH, M.L. (1993). "Direct and endothelial cell-mediated effect of CsA on the proliferation of rat smooth muscle cells *in vitro*." *Am. J. Pathol.*, 142, 149-155.
- LETCHWORTH, G.J.; WHYARD, T.C. (1984). "Characterization of ASFV antigenic proteins by immunoprecipitation." *Arch. Virol.*, 80, 265-274.
- LETESSON, J.J.; VAN DEN BROECKE, A.; MARBAIX-CLEUTER, Y.; DELCOMMENNE, M.; MAGER, A.; MAMMERICKX, M.; BURNY, A.; DEPELCHIN, A. (1991). "FACS analysis of bovine leukemia virus (BLV)-infected cell lines with monoclonal antibodies to B cells and monocyte/macrophages." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 27, 207-213.
- LEVINE, B.; HUANG, Q.; ISAACS, J.T.; REED, J.C.; GRIFFIN, D.E.; HARDWICK, J.M. (1993). "Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene." *Nature*, 361, 739-742.
- LEVY, J.A. (1991). "Mysteries of HIV: challenges for therapy and prevention". *Nature*, 333, 519-522.
- LEVY, J.A. (1993). "Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection." *Microbiological Reviews*, 57, 1, 183-289.

- LITTLE, R.G.; BERTOWSKI, L.A.; DAVID, C.S. (1990). "Inhibition of alloantigen presentation by cyclosporine." *Transplantation*, 49, 937-944.
- LIU, J. (1993). "FK506 and CsA, molecular probes for studying intracellular signal transduction." *Immunol. Today*, 14, 6, 290-295.
- LIU, J.; FARMER, J.D.J.; LANE, W.S.; FRIEDMAN, J.; WEISSMAN, I.; SCHREIBER, S.L. (1991). "Calcineurin is a common target of cyclophilin-CsA and FKBF-FK506 complexes." *Cell*, 66, 807-815.
- LIU, J.; ALBERS, M.W.; WANDLESS, T.J.; LUAN, S.; ALBERG, D.G.; BELSHAW, P.J.; COHEN, P.; McKINTOSH, C.; KLEE, C.B.; SCHREIBER, S.L. (1992). "Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity." *Biochemistry*, 31, 3896-3901.
- LIU, Z.G.; SMITH, S.W.; McLAUGHLIN, K.A.; SCHWARTZ, L.M.; OSBORNE, B.A. (1994). "Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene *nur77*." *Nature*, 367, 281-284.
- LOKEN, M.R.; BROSNAN, J.M.; BACH, B.A.; AULT, K.A. (1990). "Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry". *Cytometry*, 11, 453-459.
- LOWE, S.W.; SCHMITT, E.M.; SMITH, S.W.; OSBORNE, B.A.; TACHS, T. (1993). "p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes." *Nature*, 362, 847-849.
- LOWIN, B.; HAHNE, M.; MATTMANN, C.; TSCHOPP, J. (1994). "Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways." *Nature*, 370, 650-652.
- LUNNEY, J.K. (1994). "Current status of the swine leukocyte antigen complex." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 43, 19-28.
- LUNNEY, J.K.; PESCOVITZ, M.D. (1987). "Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte subpopulations." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 17, 135-144.
- LUNNEY, J.K.; PESCOVITZ, M.D. (1988). in "Differentiation antigens in Lymphohemopoietic tissues." Edited by Miyasaka, M.; Trnka, Z., Marcel Dekker Inc., New York and Basel.
- MACKAY, C.R. (1993). "Homing of naive, memory and effector lymphocytes." *Curr. Op. Immunol.*, 5, 423-427.
- MACKAY, C.R.; MADDOX, J.F.; BRANDON, M.R. (1987). "Lymphocyte antigens

of sheep: identification and characterization using a panel of monoclonal antibodies." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 17, 91-102.

-MACKAY, C.R.; KIMPTON, W.G.; BRANDON, M.R.; CAHILL, R.N.P. (1988). "Lymphocyte subsets show marked differences in their distribution between blood and the afferent and efferent lymph of peripheral lymph nodes". *J. Exp. Med.*, 167, 1755-1765.

-MALLON, V.R.; DOMBER, E.A.; HOLOWCZAK, J.A. (1985). "Vaccinia virus proteins on the plasma membranes of infected cells. II. Expression of viral antigens and killing of infected cells by vaccinia virus-specific cytotoxic T cells." *Virology*, 145, 1-23.

-MALMQUIST, W.A. (1962). "Propagation, modification and hemadsorption of ASFV in cell cultures." *Am. J. Vet. Res.*, 26, 141-146.

-MALMQUIST, W.A. (1963). "Serologic and immunologic studies with ASFV." *Am. J. Vet. Res.*, 24, 450-459.

-MALMQUIST, W.A.; HAY, D. (1960). "Hemadsorption and cythopatic effect produced by ASFV in swine bone marrow and buffy coat cultures." *Am. J. Vet. Res.*, 21, 104-108.

-MALORNI, W.; RIVABENE, R.; SANTINI, M.T.; PARADISI, S.; IOSI, F.; DONELLI, G. (1993). "Down-modulation of CD4 antigen during programmed cell death in U937 cells." *FEBS*, 336, 335-339.

-MANSO RIBEIRO, J.J.; ROSA AZEVEDO, J.A.; TEIXEIRA, J.D.O.; BRACO FORTE, M.C.; RODRIGUES RIBEIRO, A.M.; OLIVEIRA, E.; NORONHA, F.; GRAVE PEREIRA, C.; DIAS VIGARIO, J. (1958). "An atypical strain of Swine Fever virus in Portugal." *Bull. Off. Int. Epiz.*, 50, 516-534.

-MARRACK, P.; KAPPLER, J. (1994). "Subversion of the immune system by pathogens." *Cell*, 76, 323-332.

-MARTÍN-FERNÁNDEZ, J.; IGUAL, A.; RUEDA, A.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.; ALONSO-MARTÍ, C. (1991). "Glomerular pathology in surviving pigs experimentally infected with african swine fever virus". *Histology and histopathology*, 6, 115-121.

-MARTINS, C.L.V.; SCHOLL, T.S.; MEBUS, C.A.; FISCH, H.; LAWMAN, M.J.P. (1988). "Modulation of porcine peripheral blood-derived macrophage functions by *in vitro* infection with ASFV isolates of different virulence." *Viral Immunology*, 1, 177-190.

-MARTINS, C.L.V.; LAWMAN, M.J.P.; SCHOLL, T.; MEBUS, C.A.; LUNNEY, J.K. (1993). "ASFV specific porcine cytotoxic T cell activity." *Arch. Virol.*, 129, 211-

225.

-MASON, J. (1989). "Pharmacology of CsA (Sandimmune) VII. Pathophysiology and toxicology and toxicology of CsA in human and animals." *Pharmacol. Rev.*, 41, 423-434.

-MATLOUBIAN, M.; KOLHEKAR, S.R.; SOMASUNDARAM, T.; AHMED, R. (1993). "Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of singleamino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus." *J. Virol.*, 67, 12, 7340-7349.

-MATSUHASHI, N.; KAWASE, Y.; SUZUKI, G.(1989). "Effects of CsA on thymocyte differentiation in fetal thymus organ culture." *Cell Immunol.*, 123, 307-315.

-MAURER, F.D.; GRISEMER, R.A.; JONES, T.C.(1958). "The pathology of ASF. A comparison with hog cholera." *Am. J. Vet. Res.*, 19, 517-539.

-MAXIE, M.G. (1993). "The Urinary System." In "Pathology of domestic animals." Fourth Edition. Eds. Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Palmer, N., 447-538.

-McCAFFREY, P.G.; PERRINO, B.A.; SODERLING, T.R.; RAO, A. (1993). "NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs." *J. Biol. Chem.*, 268, 3747-3752.

-McCABE, M.J. Jr.; ORRENIUS, S. (1992). "Deletion and depletion: the involvement of viruses and environmental factors in T-lymphocyte apoptosis." *Lab. Invest.*, 66, 4, 403-406.

-McCHESNEY, M.B.; OLDSTONE, M.B.A. (1987). "Viruses perturb lymphocyte functions: Selected principles characterizing virus-induced immunosuppression." *Ann. Rev. Immunol.*, 5, 279-304.

-McCULLOUGH, K.C.; SCHAFFNER, R.; FRAEFEL, W.; KIHM, U. (1993). "The relative density of CD44-positive porcine monocytic cell populations varies between isolations and upon culture and influences susceptibility to infection by ASFV." *Immunol. Lett.*, 37, 83-90.

-McFARLAND, H.I.; NAHILL, S.R.; MACIASZEK, J.W.; WELSH, R.M. (1992). "CD11b (Mac-1): a marker for CD8⁺ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection." *J. Immunol.*, 149, 1326-1333.

-McVICAR, J.W. (1984). "Quantitative aspects of the transmission of African Swine Fever". *Am. J. Vet. Res.*, 45, 8, 1535-1541.

-MEBUS, C.A. (1988). "African Swine Fever." *Adv. Vir. Res.*, 35, 251-269.

- MEBUS, C.A.; DARDIRI, A.H. (1980). "Western hemisphere isolates of african swine fever virus: Asymptomatic carriers and resistance to challenge inoculation". Am. J.Vet. Res., 41, 1867-1869.
- MEBUS, C.A.; GREGG, D.A. (1985). "Evaluation of *in vivo* function of macrophages in ASF." Seminario Hispano-Norteamericano sobre Peste Porcina Africana, Madrid.
- MEBUS, C.A.; McVICAR, J.W.; DARDIRI, A.H. (1981). "Comparison of the pathology of high and low virulence African Swine Fever infections." In African Swine Fever. ED. P.J. Wilkinson. EUR 8466 EN, Proc CEC/FAO research seminar, Sardinia, september, 183-194.
- MEERS, J.; DEL FIERRO, G.M.; COPE, R.B.; PARK, H.S.; GREENE, W.K.; ROBINSON, W.F. (1993). "Feline immunodeficiency virus infection: plasma, but no peripheral blood mononuclear cell virus titer is influenced by zidovudine and cyclosporine." Arch. Virol., 132, 67-81.
- MELLENCAMP, M.W.; O'BRIEN, P.C.M.; STEVENSON, J.R. (1991). "Pseudorabies virus-induced suppression of major histocompatibility complex class I antigen expression." J. Virol., 65, 3365-3368.
- MELLOR, P.S.; WILKINSON, P.J. (1985). "Experimental transmission of African Swine Fever by *Ornithodoros savignyi* (Audouin)." Res. vet. Sci., 39, 353-356.
- MENDOZA, C.; VIDEGAÍN, S.P.; ALONSO, F. (1991). "Inhibition of natural-killer activity in porcine mononuclear cells by ASFV." Res. Vet. Sci., 51, 317-321.
- MINAMI, Y.; KONO, T.; MIYAZAKI, T.; TANIGUCHI, T. (1993). "The IL-2 receptor complex: its structure, function and target genes." Annu. Rev. Immunol., 11, 245-268.
- MÍNGUEZ, I; RUEDA, A; DOMÍNGUEZ, J, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.(1988). "Double labeling immunohistological study of African Swine Fever Virus-infected spleen and lymph nodes". Veterinary Pathology, 25, 193-198.
- MONTGOMERY, R.E. (1921). "On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya colony)". Journal of comparative pathology and therapeutics, 34, 3.
- MONTGOMERY, R.E. (1921a). "On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony)." Journal of comparative pathology and therapeutics, 34, 4.
- MORAHAN, P.S.; CONNOR, J.R.; LEARY, K.R.(1985). "Viruses and the versatile macrophage". British medical bulletin, 41, 1, 15-21.

- MORRIS, P.J. (1981). "Cyclosporin A." *Transplantation*, 32, 5, 349-353.
- MOSKOPHIDIS, D.; LOHLER, J.; LEHMANN-GRUBE, F.(1987). "Antiviral antibody-producing cells in parenchymatous organs during persistent virus infection." *J. Exp. Med.*, 165, 705-719.
- MOSKOPHIDIS, D.; PIRCHER, H.; CIERNIK, I.; ODERMATT, B; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. (1992). "Suppression of Virus-specific antibody production by CD8⁺ class I-restricted antiviral cytotoxic T cells in vivo". *J. Virol.*, 66, 6, 3661-3668.
- MOSKOPHIDIS, D.; LECHNER, F.; PIRCHER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. (1993). "Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells." *Nature*, 362, 758-761.
- MOSMANN, T.R.; COFFMANN, R.L. (1987). "Two types of mouse helper T-cell clone. Implications for immune regulation". *Immunology today*, 8, 223-227.
- MOSMANN, T.R.; COFFMANN, R.L. (1989). "TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Ann. Rev. Immunol.*, 7, 145-173.
- MOULTON, J.; COGGINGS, L. (1968). "Comparison of lesions in acute and chronic African Swine Fever". *Cornell veterinary*, 58, 364-388.
- MOULTON, J.; COGGINS, L. (1968a). "Synthesis and cytopathogenesis of African Swine Fever Virus in porcine cultures". *Am. J. Vet. Res.*, 29, 2, 219-232.
- MOULTON, J.E.; PAN, I.C.; HESS, W.R.; DEBOER, C.J.; TESSLER, J. (1975) "Pathologic features of chronic pneumonia in pigs with experimentally induced African Swine Fever". *Am. J. Vet. Res.*, 36, 27-32.
- MOURA-NUNES, J.F.; VIGARIO, J.D.; TERRINHA, A.M. (1975). "Ultrastructural study of ASFV replication in cultures of swine bone marrow cells." *Arch. Virol.*, 49, 59-66.
- MOURA-NUNES, J.F.; VIGARIO, J.D.; CASTRO-PORTUGAL, F.L.; FERREIRA, C.A.; DE MATOS, A.P.A. (1977). "Structure of African Swine Fever virus." *Comm. Eur. Comm. EUR 5904 EN*, 543-554.
- MOURA-NUNES, J.F.; NUNES-PETISCA, J.L. (1983). "Replication of ASFV in lymph nodes of experimentally infected swine." *Comm. Eur. Comm.*, EUR 8466 EN, Sardinia.
- MUNN, D.H.; BEALL, A.C.; SONG, D.; WRENN, R.W.; THOCKMORTON, D.C.

(1995). "Activation apoptosis in human macrophages: Developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon γ ." *J. Exp. Med.*, 181, 127-136.

-MURPHY, D.B. (1993). "T cell mediated immunosuppression." *Curr. Op. Immunol.*, 5, 411-417.

-MURPHY, K.M.; HEINBERGER, A.B.; LOH, D.Y. (1990). "Induction by antigen of intrathymic apoptosis of $CD4^+CD8^+TCR^lo$ thymocytes *in vivo*." *Science*, 250, 1720.

-MURRAY, J.S.; PFEIFFER, C.; MADRI, J.; BOTTOMLY, K. (1992). "Major histocompatibility complex (MHC) control of $CD4^+$ T cell subset activation II. A single peptide induces either humoral or cell-mediated responses in mice of distinct MHC genotype." *Eur. J. Immunol.*, 22, 559-565.

-MUSTAFA, M.; DRENER, P.; SUN, J.B.; LINK, H.; OLSSON, T. (1993). "Immunopharmacological modulation of experimental allergic encephalomyelitis: low dose CsA treatment causes disease relapse and increased systemic T and B cell-mediated myelin directed-autoimmunity." *Scand. J. Immunol.*, 38, 499-507.

-NABAVI, N.; FREEMAN, G.J.; GAULT, A.; NADLER, L.M.; GLIMDER, L.H. (1992). "Signalling through the MHC-II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression." *Nature*, 360, 266-288.

-NARAYAN, O.; WOLINSKY, J.S.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBER, J.D.; GRIFFEN, D.E.; CORK, L.C. (1982). "Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats." *J. Gen. Virol.*, 59, 345-356.

-NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E. (1989). "Biology and pathogenesis of Lentiviruses." *J. Gen. Virol.*, 70, 1617-1639.

-NAVIA, M.A.; PEATTIE, D.A. (1993). "Structure-based drug design: applications in immunopharmacology and immunosuppression." *Immunol. Today*, 14, 6, 296-302.

-NEEFJES, J.J.; MOMBURG, F. (1993). "Cell biology of antigen presentation." *Curr. Op. Immunol.*, 5, 27-34.

-NEILAN, J.G.; LU, Z.; AFONSO, C.L.; KUTISH, G.F.; SUSSMAN, M.D.; ROCK, D.L. (1993). "An ASFV gene with similarity to the proto-oncogene *bcl-2* and the Epstein-Barr virus gene *BHRF1*." *J. Virol.*, 67, 4391-4394.

-NESER, J.A.; PHILLIPS, T.; THOMSON, G.R. (1986). "ASF. Morphological changes and virus replication in blood platelets of pigs infected with virulent

haemadsorbing and non-haemadsorbing isolates." Onderstepoort J. Vet. Res., 53, 133-141.

-NESER, J.A.; COTZEE, C. (1987). "African Swine Fever virus II. Functional disturbances of thrombocytes in pigs infected with virulent haemadsorbing and non-haemadsorbing virus isolates." Onderstepoort J. Vet. Res., 54, 147-155.

-NEWMAN, M.J.; ISSEL, C.J.; TRUAX, R.E.; POWELL, M.D.; HOROHOV, D.W.; MONTELARO, R.C. (1991). "Transient suppression of equine immune responses by equine infectious anemia virus (EIAV)." Virology, 184, 55-66.

-NGUYEN, D.T.; ESKANDURI, M.K.; DEFARGE, L.E.; RAIFORD, C.L.; STRIETER, R.M.; KUNKEL, S.L.; REMICK, D.G. (1990). "CsA modulation of TNF gene expression and effects *in vivo* and *in vitro*." J. Immunol, 144, 3822-3828.

-NISHIOKA, W.K.; WELSH, R.M. (1994). "Susceptibility of cytotoxic T lymphocyte induced apoptosis is a function of the proliferative status of the target." J. Exp. Med., 769-774.

-NORLEY, S.G.; WARDLEY, R.C. (1982). "Complement mediated lysis of ASFV-infected cells." Immunology, 46, 75-81.

-NORLEY, S.G.; WARDLEY, R.C. (1983). "Effector mechanisms in the pig: Antibody dependent cellular cytotoxicity of ASFV infected cells." Res. Vet. Sci., 35, 75-79.

-NORLEY, S.G.; WARDLEY, R.C. (1983a). "Investigation of porcine natural killer cell activity with reference to ASFV infection." Immunology, 49, 593-597.

-NORLEY, S.G.; WARDLEY, R.C. (1984). "Cytotoxic lymphocytes induced by ASF infection." Res. Vet. Sci., 37, 255-257.

-ODERMATT, B.; EPPLER, M.; LEIST, T.P.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. (1991). "Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8252-8256.

-O'GARRA, A.; MURPHY, K. (1993). "T-cell subsets in autoimmunity." Curr. Op. Immunol., 880-886.

-OHMANN, B.; BABUIK, L.A. (1986). "Viral infections in domestic animals as models for studies of viral immunology and pathogenesis." J. Gen. Virol., 66, 1-25.

-O'KEEFE, S.J.; TAMURA, J.; KINCAID, R.L.; TOCCI, M.J.; O'NEILL, E.A. (1992). "FK506 and CsA sensitive activation of the IL-2 promoter by calcineurin." Nature,

357, 692-694.

-OLDSTONE, M.B.A. (1987). "Molecular mimicry and autoimmune disease." *Cell*, 50, 819-820.

-OLDSTONE, M.B.A. (1989). "Viral persistence". *Cell*, 56, 517-520.

-OLDSTONE, M.B.A. (1989a). "Viral alteration of cell function ". *Scientific American*, 34-40.

-OLDSTONE, M.B.A. (1991). "Molecular anatomy of viral persistence." *J. Virol*, 65, 6381-6386.

-OLDSTONE, M.B.A.; TISHON, A.; SCHWIMMBECK, P.L.; SHYP, S.; LEWICKI, H.; DYRBERG, T. (1990). "Cytotoxic T lymphocytes do not control lymphocytic choriomeningitis virus infection of BB diabetes-prone rats." *J. Gen. Virol.*, 71, 785-791.

-OLTVAI, Z.N.; MILLIMAN, C.L.; KORSMEYER, S.J. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." *Cell*, 74, 609-619.

-ONISK, D.V.; BORCA, M.V.; KUTISH, G.; KRAMER, E.; IRUSTA, P.; ROCK, D.L. (1994). "Passively transferred ASFV antibodies protect against lethal infection." *Virology*, 198, 350-354.

-O'ROURKE, A.M.; MESCHER, M.F. (1992). "Cytotoxic T lymphocyte activation involves a cascade of signalling and adhesion events." *Nature*, 358, 253-255.

-O'ROURKE, A.M.; ROGERS, J.; MESCHER, M.F. (1990). "Activated CD8⁺ binding to class I protein mediated by the T cell receptor results in signalling." *Nature*, 346, 187-189.

-ORTÍN, J.; VIÑUELA, E. (1977). "Requirement of cell nucleus for ASFV replication in Vero cells." *J. Virol.*, 21, 902-905.

-ORTÍN, J.; ENJUANES, L.; VIÑUELA, E. (1979). "Cross-links in African Swine Fever virus DNA." *J. Virol.*, 31, 579-583.

-PÄÄBO, S.; NILSSON, T.; PETERSON, P.A. (1986). "Adenoviruses of subgenera B, C, D and E modulate cell-surface expression of major histocompatibility complex class I antigens." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9665-9669.

-PADOVAN, C.S.; BEHR, J.; ALLMELING, A.M.; GERLACH, J.T.; VOGELMEIER, C.; KROMBACH, F.P. (1992). "Immunophenotyping of lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid. Comparison of flow cytometric and

immunocytochemical techniques". *J. Immunol Meth.*, 147, 27-32.

-PAHWA, S.; PAHWA, R.; SAXINGER, C.; GALLO, R.C.; GOOD, R.A. (1985). "Influence of the human T-lymphotropic virus/lymphadenopathy-associated virus on functions of human lymphocytes: Evidence for immunosuppressive effects and polyclonal B-cell activation by banded viral preparations." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 8198-8202.

-PALUMBO, G.J.; BULLER, R.M.; GLASGOW, W.C. (1994). "Multigenic evasion of inflammation by poxviruses." *J. Virol.*, 68, 3, 1737-1749.

-PAN, I.C. (1987). "Spontaneously susceptible cells and cell culture methodologies for ASFV." En *African Swine Fever*, pp 81-125. Ed. Y. Becker, Martinus Nijhoff Publishing. Boston.

-PAN, I.C.; HESS, W.R. (1985). "Diversity of African Swine Fever virus.", *Am. J. Vet. Res.*, 46, 2, 314-320.

-PAN, I.C.; DeBOER, C.J.; HESS, W.R. (1972). "ASF. Application of immunoelectroosmophoresis for the detection of antibody." *Can. J. Comp. Med.*, 36, 309-316.

-PAN, I.C.; MOULTON, J.E.; HESS, W.R. (1975). "Immunofluorescent Studies on chronic pneumonia in swine with experimentally induced African Swine Fever." *Am. J. Vet. Res.*, 36, 4, 379-386.

-PAN, I.C.; SHIMIZU, M.; HESS, W.R. (1978). "ASF: microplaque assay by an immunoperoxidase method." *Am. J. Vet. Res.*, 39, 491-497.

-PAN, I.C.; SHIMIZU, M.; HESS, W.R. (1980). "ASFV replication in cells cultures." *International Pig Veterinary Society Congress June-July, Copenhagen.*

-PANG, T. (1983). "DTH: probable role in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome." *Rev. Infect. Dis.*, 5, 346-352.

-PANTALEO, G.; DEMAREST, J.F.; SOUDEYNS, H.; GRAZIOSI, C.; DENIS, F.; ADELSBERGER, J.W.; BORROW, P.; SAAG, M.S.; SHAW, G.M.; SEKALY, R.P.; FAUCI, A.S. (1994). "Major expansion of CD8⁺ T cells with a predominant V β usage during the primary immune response to HIV." *Nature*, 370, 463-467.

-PARAMITHIOTIS, E.; JACOBSEN, K.A.; RATCLIFE, M.J.H. (1995). "Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in the Bursa of Fabricius." *J. Exp. Med.*, 181, 105-113.

-PARKER, D.J.; HASLAM, P.L. (1988). "A new method to improve discrimination between lymphocytes and contaminating erythrocytes in flow cytometric analytical

techniques." J. Immunol. Meth., 110, 37-45.

-PASSAQUALA, M.; dos SANTOS, A.; VILANOVA, M.; PORTO, M.T.; SANTAREM, M.G.; LIMA, M.(1988). "Correlation between B-cell mitogenicity and immunosuppressor effects of a protein released by porcine monocytes infected with ASFV". Am. J. Vet. Res., 49, 11, 1955-1961.

-PASTOR, M.J.; ESCRIBANO, J.M. (1990). "Evaluation of sensitivity of different antigen and DNA-hybridization methods in ASFV detection." J. Virol. Methods., 28, 67-78.

-PASTOR, M.J.; LAVIADA, M.D.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.; ESCRIBANO, J.M. (1987). "Detection of ASFV antibodies by immunoblotting assay." Can. J. Vet. Res., 53, 105-107.

-PAUL, W.E. Editor (1985). "Fundamental Immunology." Segunda Edición, Raven Press.

-PECHHOLD, K; KABELITZ, D. (1992). "A rapid staining procedure for two color analysis of lymphocyte antigen expression". J. Immunol. Meth., 147, 135-140.

-PÉREZ, J. (1992). "Peste porcina africana experimental (aislados E70 y E75): estudio inmunohistopatológico del hígado y pulmón." Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.

-PESCOVITZ, M.D.; LUNNEY, J.K.; SACHS, D.H. (1984). "Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL." J. Immunol., 133, 368-374.

-PESCOVITZ, M.D.; SAKOPOULOS, A.G.; GADDY, J.A.; HUSMANN, R.J.; ZUCKERMANN, F.A. (1994). "Porcine peripheral blood CD4⁺/CD8⁺ dual expressing T cells." Vet. Immunol. Immunopathol., 43, 53-62.

-PIRCHER, H.; MOSKOPHIDIS, D.; ROHRER, U.; BURKI, K.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. (1990). "Viral escape by selection of cytotoxic T-cell resistant virus variants in vivo". Nature, 346, 629-633.

-PLOWRIGHT, W.; BROWN, F.; PARKER, J. (1966). "Evidence for the type of nucleic acid in African Swine Fever virus." Arch. Ges. Virusforsch., 19, 289-304.

-PLOWRIGHT, W.; PARKER, J.; PEIRCE, M.A.(1969). "The epizootiology of ASF in Africa." Vet. Rec. 85, 668-674.

-POLLARD, M.; SHARON, N.; TEAH, B.A. (1968). "Congenital Lymphocytic choriomeningitis virus infection in gnotobiotic mice." Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 127, 755-761.

- POLO JOVER, F.; SÁNCHEZ-BOTIJA, C. (1961). "African Swine Fever in Spain." Bull. Off. Int. Epiz., 55, 107-147.
- POWRIE, F.; COFFMAN, R.L. (1993). "Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention." Immunol. Today, 14, 6, 270-274.
- PRUD'HOMME, G.J.; SNADERS, R.; PARFREY, N.A.; STE-CROIX, H. (1991). "T cell maturation and clonal deletion in CsA induced autoimmunity." J. Autoimmun., 4, 357-368.
- PUJOLS, J; BADIOLA, J.I.; PEREZ DE ROZAS, A.M.; ROSELLA, R; CARRERAS, J. (1991). "Papel que tienen los cerdos portadores en el mantenimiento y transmisión del virus de la PPA.I. Estudio epizootiológico". Medicina veterinaria, 8, 9, 481-489.
- PUNT, J.A.; OSBORNE, B.A.; TAKAHAMA, Y.; SHARROW, S.O.; SINGER, A. (1994). "Negative selection of CD4⁺ CD8⁺ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28." J. Exp. Med., 179, 709-713.
- QUESNIAUX, V.F. (1993). "Immunosuppressants: tools to investigate the physiological role of cytokines." Bioessays, 15, 731-739.
- QUEZADA, M.; MOYANO, T.; CARRASCO, L.; JOVER, A. (1989). "Lesiones del riñón de cerdos experimentalmente infectados con el virus de la peste porcina africana." Anaporc, 76, 36-37.
- QUINTERO, J.C.; WESLEY, R.D.; WHYARD, T.C.; GREGG, D.; MEBUS, C.A. (1986). "*In vitro* and *in vivo* association of African swine fever virus with swine erythrocytes". Am. j. vet. res., 47, 5, 1125-1131.
- RAFF, M.C. (1992). "Social control on cell survival and cell death." Nature, 356, 397-400.
- RAHELU, M.; WILLIAMS, G.T.; KUMARARATNE, D.S.; EATON, G.C.; GASTON, J.S.H. (1993). "Human CD4⁺ cytolytic T cells kill antigen-pulsed target T cells by induction of apoptosis." J. Immunol., 150, 11, 4856-4866.
- RAMSAY, A.J.; RUBY, J.; RHAMSAW, I.A. (1993). "A case for cytokines as effector molecules in the resolution of virus infection." Immunol. Today, 14, 155-157.
- RAZVI, E.S.; WELSH, R.M. (1993). "Programmed cell death of T lymphocytes during acute viral infection: a mechanism for virus-induced immune deficiency." J. Virol., 67, 5754-5765.

- REED, I.G.; MUENCH, R.H. (1938). "A simple method to estimating fifty percent end points." *Am. J. Hyg.*, 27, 493-497.
- REIDY, M.A.(1991). "Effect of CsA on vascular smooth muscle cells." *Lab. Invest.*, 65, 1, 1-2.
- RIDDELL, S.R.; GILBERT, M.J.; GREENBERG, P.D. (1993). "CD8⁺ cytotoxic cell therapy of cytomegalovirus and HIV infection." *Curr. Op. Immunol.*, 5, 484-491.
- RINALDO, C.R.Jr. (1994). "Modulation of major histocompatibility complex antigen expression by viral infection." *Am. J. Pathol.*, 144, 4, 637-650.
- ROBERTS, P.C.; LU, Z.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L. (1993). "Three adjacent genes of ASFV with similarity to essential poxvirus genes." *Arch. Virol.*, 132, 331-342.
- ROBINSON, W.F.; MAXIE, M.G. (1993). "The hematopoietic system." In *Pathology of Domestic Animals. Fourth Edition*. Eds. Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Palmer, N. Academic Press Inc.
- RODRIGUES, M.; NUSSENZWEIG, R.S.; ROMERO, P.; ZAVALA, F. (1992). "The *in vivo* cytotoxic activity of CD8⁺ T cell clones correlates with their levels of expression of adhesion molecules." *J. Exp. Med.*, 175, 895-905.
- RODRÍGUEZ, F.; ALCARAZ, C.; EIRAS, A.; YÁÑEZ, R.; RODRÍGUEZ, J.M.; ALONSO, C.; RODRÍGUEZ, J.F.; ESCRIBANO, J.M. (1994). "Characterization and molecular basis of heterogeneity of the ASFV envelope protein p54." *J. Virol.*, 68, 7244-7252.
- RODRÍGUEZ, J.M.; YÁÑEZ, R.J.; ALMAZÁN, F.; VIÑUELA, E.; RODRÍGUEZ, J.F.(1993). "ASFV encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells." *J. Virol.*, 67, 5312-5320.
- RODRÍGUEZ, J.M.; YÁÑEZ, R.J.; PAN, R.; RODRÍGUEZ, J.F.; SALAS, M.L.; VIÑUELA, E. (1994). "Multigene families in ASFV: family 505." *J. Virol.*; 68, 4, 2746-2751.
- ROITT, I.(1992). "Essential Immunology." Seventh Edition. Blackwell Scientific Publications.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D.(1989). "Immunology." Second edition. Churchill-Livingstone. Gover medical publishing.
- ROOST, H.; CHARAN, S.; GOBERT, R.; RÜEDI, E.; HENGARTNER, H.; ALTHAGE, A.; ZINKERNAGEL, R.M. (1988). "An acquired immune suppression in mice caused by infection with lymphocytic choriomeningitis virus." *Eur. J. Immunol.*, 18, 511-518.

- ROUSE, B.T.; HOROHOV, D.W. (1986). "Immunosuppression in viral infections." Rev. Infec. Dis., 8, 6, 850-873.
- ROUVIER, E.; LUCIANI, M.F.; GOLSTEIN, P. (1993). "Fas involvement in Ca^{2+} -independent T cell mediated cytotoxicity." J. Exp. Med., 177, 195-200.
- RUIZ-GONZALVO, F.; COLL, J. (1993). "Characterization of a soluble hemagglutinin induced in african swine fever virus-infected cells." Virology, 196, 769-777.
- RUIZ-GONZALVO, F.; CARNERO, M.E.; BRUYEL, V. (1983). "Immunological responses of pigs to partially attenuated ASFV and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses." Comm. Eur. Comm. EUR/8466 EN, 206-216.
- RUIZ-GONZALVO, F.; CARNERO, M.E.; CABALLERO, C.; MARTÍNEZ, J. (1986). "Inhibition of ASF infection in the presence of immune sera *in vivo* and *in vitro*." Am. J. Vet. Res., 47, 1249-1252.
- RUIZ-GONZALVO, F.; CABALLERO, C.; MARTINEZ, J.; CARNERO, M.E. (1986a). "Neutralization of ASFV by sera from ASF resistant pigs." Am. J. Vet. Res., 47, 1249-1252.
- RUIZ-GONZALVO, F.; HAAG, J.; CARNERO, R.; LAURENADIE, B.(1966). "Peste Porcine Africaine. Adaptatio d ´une souche de virus aux cultures de rein de porc." Rec. Med. Vet., 142, 1237-1249.
- RUSSELL, J.H.; WHITE, C.L.; LOH, D.Y.; MELEEDY-REY, P. (1991). "Receptor-stimulated death pathway is openend by antigen in mature T cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2151-2155.
- SAALMÜLLER, A.; BRYANT, J. (1994). "Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines." Vet. Immunol. Immunopathol., 43, 45-52.
- SAALMÜLLER, A.; HIRT, W.; REDDEHASE, M.J. (1989). "Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic $CD4^-CD8^-$ and $CD4^+CD8^+$ porcine T lymphocytes." Eur. J. Immunol., 19, 2011-2016.
- SAALMÜLLER, A.; HIRT, W.; REDDEHASE, M. (1990). "Porcine gamma/delta T lymphocyte subsets differing in their propensity to home to lymphoid tissue". Eur. J. Immunol., 20, 2343-2346.
- SACHS, D.H. (1984).In "Fundamental Immunology." W.E. Paul ed. Raven Press, New York, p. 303.
- SAENZ, N.C.; HENDREN, R.B.; SCHOOF, D.D.; FOLKMAN, J. (1991). "Reduction

of smooth muscle hyperplasia in vein grafts in athymic rats." *Lab. Invest.*, 65, 15-18.

-SAHA, K.; YUEN, P.H.; WONG, P.K.Y. (1994). "Murine retrovirus-induced depletion of T cells is mediated through activation-induced death by apoptosis." *J. Virol.*, 68, 4, 2735-2740.

-SALMON, M.; PILLING, D.; BORTHWICK, N.J.; VINER, N.; JANOSSY, G.; BACON, P.A.; AKBAR, A.N. (1994). "The progressive differentiation of primed T cells is associated with an increased susceptibility to apoptosis." *Eur. J. Immunol.*, 24, 892-899.

-SALVATO, M.; BORROW, P.; SHIMOMAYE, E.; OLDSTONE, M.B.A. (1991). "Molecular basis of viral persistence: a single amino acid change in the glycoprotein of Lymphocyte Choriomeningitis Virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-Lymphocyte response and establishment of persistence." *J. Virol.*, 65, 4, 1863-1869.

-SÁNCHEZ-BOTIJA, C. (1963). "Reservorios del virus de la PPA. Investigación del virus de la PPA en los artrópodos mediante la prueba de la hemadsorción." *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 60, 895-899.

-SÁNCHEZ-BOTIJA, C. (1963a). "Modificación del virus de la PPA en cultivos celulares. Contribución al conocimiento de la acción patógena y del poder de protección de las estirpes atenuadas." *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 60, 901-919.

-SÁNCHEZ-BOTIJA, C. (1982). "Peste Porcina Africana. Nuevos desarrollos." *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1 (4), 991-1029.

-SÁNCHEZ-BOTIJA, C.; ORDÁS, A. (1980). "Peste Porcina Africana. Patología y clínica del ganado porcino." *Noticias Neosán*, 119-154.

-SÁNCHEZ-BOTIJA, C.; ORDÁS, A.; GONZÁLEZ, J. (1970). "La inmunofluorescencia indirecta aplicada a la investigación de anticuerpos de la PPA. Su valor para el diagnóstico." *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 74, 397-417.

-SÁNCHEZ-VIZCAÍNO. (1992). "African Swine Fever." En "Diseases of Swine", 7ª edición. Eds. Leman, A.D; *et al.*, Wolfe Publishing Ltd., 228-236.

-SÁNCHEZ-VIZCAÍNO y colaboradores. (1988). "Peste Porcina Africana." *Monografías del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*, 2ª edición.

-SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.; MARTÍN, L.; ORDÁS, A. (1979). "Adaptación y evaluación del enzoinmunoensayo para la detección de anticuerpos para la PPA." *Laboratorio*, 67, 311-319.

- SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.; MEBUS, C.A.; McVICAR, J.W.; VALERO, F. (1982). "Studies on humoral and cell mediated immunity in pigs and piglets infected with different field isolates of ASFV". CEE Eur. 8466 EN, 195-206.
- SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.; SLAUSON, D.O.; RUIZ-GONZALVO, F.; VALERO, F. (1981). "Lymphocyte function and cell-mediated immunity in pigs with experimentally induced ASFV". Am. J. Vet. Res., 42, 8, 1335-1341.
- SANTARÉN, J.F.; VIÑUELA, E. (1986). "ASFV-induced polypeptides in Vero cells." Virus Res., 5, 391-405.
- SANTOS RIBEIRO, A.; PASSAQUALA, M.; VILANOVA, M.; PORTO, M.T.; COUTINHO, A. (1991). "Role of B and T lymphocytes in the specific immunosuppression induced by a protein released by porcine monocytes infected with ASFV". Int. Immunol., 3, 2, 165-174.
- SANZ, A.; GARCÍA-BARRENO, B.; NOGAL, M.L.; VIÑUELA, E.; ENJUANES, L. (1985). "Monoclonal antibodies specific for African Swine Fever virus proteins." J. Virol., 54, 1, 199-206.
- SASAKI, D.T.; DUMAS, S.E.; ENGELMAN, E.G. (1987). "Discrimination of viable and non viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence." Cytometry, 8, 413-420.
- SCHENA, M.; LARSSON, L.G.; GOTTARDI, D.; GIADANO, G.; CARLSSON, M.; NILSSON, K.; CALIGARIS-CAPPIO, F. (1992). "Growth and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells." Blood, 79, 2981-2989.
- SCHLAFER, D.; McVIVAR, J.W.; MEBUS, C.A. (1984). "ASF convalescent sows: subsequent pregnancy and the effect of calostrual antibody on challenge inoculation of their pigs." Am. J. Vet. Res., 45, 7, 1361-1366.
- SCHLAFER, D.; MEBUS, C.A.; McVICAR, J.W. (1984a). "ASF in neonatal pigs: passively acquired protection from calostrum or serum of recovered pigs." Am. J. Vet. Res., 45, 7, 1367-1372.
- SCHLESINGER, J.J.; BRANDISS, M.W.; PUTNAK, J.R.; WALSH, E.E. (1990). "Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody." J. Gen. Virol., 71, 593-599.
- SCHITTMAN, S.M.; LANE, H.C.; GREENHOUSE, J.; JUSTEMENT, J.S.; BASELER, M.; FAUCI, A.S. (1990). "Preferential infection of CD4⁺ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6058-6062.

- SCHOLL, T.; LUNNEY, J.K.; MEBUS, C.A.; DUFFY, E.; MARTINS, C.V.M. (1989). "Virus specific cellular blastogenesis and interleukin-2 production in swine after recovery from ASFV." *Am. J. Vet. Res.*, 50, 1781-1786.
- SCHRIER, R.D.; McCUTCHAN, J.A.; WILEY, C.A. (1993). "Mechanisms of immune activation of Human Immunodeficiency Virus (HIV) in monocyte/macrophages." *J. Virol.*, 67, 10, 5713-5720.
- SEDER, R.A.; PAUL, W.E. (1994). "Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells." *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 635-674.
- SEDMAN, D.D.; GUGLIELMO, A.M.; KNIGHT, D.A.; BIRMINGHAM, D.J.; HUANG, E.H.; WALDMAN, W.J. (1994). "Cytomegalovirus inhibits MHC class II expression on infected endothelial cells." *Am. J. Pathol.*, 144, 683-692.
- SHAWAR, S.M.; VYAS, J.M.; RODGERS, J.R.; RICH, R.R. (1994). "Antigen presentation by MHC class I-B molecules." *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 839-880.
- SHEARER, G.M.; SCHMITT-VERHULST, A.M. (1977). "MHC restricted cell-mediated immunity." *Adv. Immunol.*, 25, 55-91.
- SHEARER, G.M.; CLERICI, M. (1991). "Early T-helper cell defects in HIV infection." *AIDS*, 5, 245-253.
- SHERRY, B.; LI, X-Y.; TYLER, K.L.; CULLEN, J.; VIRGIN IV, H.W. (1993). "Lymphocytes protect against and are not required for reovirus-induced myocarditis." *J. Virol.*, 67, 10, 6119-6124.
- SHI, L.; KAM, C.M.; POWERS, J.C.; AEBERSOLD, R.; GREENBERG, A.H. (1992). "Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrates and target cell interactions." *J. Exp. Med.*, 176, 1521-1529.
- SHI, Y.; SAHAI, B-M.; GREEN, D.R. (1989). "CsA inhibits activation induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes." *Nature*, 339, 625-627.
- SHIBATA, S.; KYUWA, S.; LEE, S-K.; TOYODA, Y.; GOTO, N. (1994). "Apoptosis induced in mouse hepatitis virus-infected cells by a virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte clone." *J. Virol.*, 68, 11, 7540-7545.
- SHIMIZU, M.; PAN, I.C.; HESS, W.R. (1977). "Cellular immunity demonstrated in pigs infected with ASFV." *Am. J. Vet. Res.*, 38, 27-31.
- SHINOHARA, N.; WATANABE, M.; SACHS, D.H.; HOZUMI, N. (1988). "Killing of antigen-reactive B cells by class II-restricted, soluble antigen-specific CD8⁺ cytolytic lymphocytes". *Nature*, 336, 481-484.

- SHORTMAN, K.; SCOLLAY, R. (1994). "Death in the thymus." *Nature*, 372, 44-45.
- SIERRA, M.A.; BERNABÉ, A.; MOZOS, E.; MÉNDEZ, A.; JOVER, A.(1987). "Ultrastructure of the liver in pigs with experimental ASF." *Veterinary Pathology* 24, 460-462.
- SIERRA, M.A.; CARRASCO, L.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; MARTÍN de las MULAS, J.; MÉNDEZ, A.; JOVER, A. (1990). "Pulmonary intravascular macrophages in lungs of pigs inoculated with African Swine Fever virus of differing virulence." *J. Comp. Pathol.*, 102, 323-334.
- SIERRA, M.A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; CARRASCO, L.; FERNÁNDEZ, A.; MOZOS, E.; JOVER, A. (1991). "*In vivo* study of hemadsorption in African Swine Fever Virus infected cells". *Vet. Pathol.*, 28, 178-181.
- SIERRA, M.A.; QUEZADA, M.; FERNÁNDEZ, A.; CARRASCO, L.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; MARTÍN DE LAS MULAS, J.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.(1989). "Experimental African Swine Fever: Evidence of the virus in interstitial tissues of the kidney". *Vet. Pathol.*, 26, 173-176.
- SIGAL, N.H.; DUMONT, F.J.; DURETTE, P.; SIEKERKA, J.J.; PETERSON, L.; RICH, D.H.; DUNLAP, B.E.; STARUCH, M.J.; MELINS, M.R.; KOPRAK, S.L. (1991). "Is cyclophilin involved in the immunosuppressive and nephrotoxic mechanism of action of CsA?" *J. Exp. Med.*, 172, 619-628.
- SIGAL, N.H.; DUMONT, F.J. (1992). "CsA, FK-506 and rapamycin: pharmacological probes of lymphocyte signal transduction." *Ann. Rev. Immunol.*, 10, 519-560.
- SILVERBERG, B.A.; JAKAB, G.J.; THOMSON, R.G.; WARR, G.A.; BOO, K.S. (1979). "Ultrastructural alterations in phagocytic functions of alveolar macrophages after parainfluenza virus infection." *J. Reticuloendothel. Soc.*, 25, 405-416.
- SIMÓN-MATEO, A.; ANDRÉS, G.; VIÑUELA, E.(1993). "Polyprotein processing in ASFV: a novel gene expression strategy for a DNA virus." *Embo. J.*; 12, 7, 2977-2987.
- SISSONS, J.G.P.; BORYSIEWICZ, L.K. (1985). "Viral Immunopathology." *British Medical bulletin*, 41, 34-40.
- SISSONS, J.G.P.; OLDSTONE, M.B.A.(1985). "Viral pathogenesis." In *Virology*, edited by B.N. Fields *et al.* Raven Press, New York, 265-279.
- SLAUSON, D.O.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.(1981). "Leukocyte-dependent platelet vasoactive amine release and immunocomplex deposition in ASF." *Vet.*

Pathol., 18, 813-826.

-SOGO, J.M.; ALMENDRAL, J.M.; TALAVERA, A.; VIÑUELA, E. (1984). "Terminal and internal inverted repetitions in African Swine Fever virus DNA." *Virology*, 133, 271-275.

-SONNENFELD, G.; MANDEL, A.D.; MERIGAN, T.C. (1977). "The immunosuppressive effect of type II mouse interferon preparations on antibody production." *Cell. Immunol.*, 34, 193-206.

-SQUIER, M.K.T.; COHEN, J.J. (1994). "Cell-mediated cytotoxic mechanisms." *Curr. Op. Immunol.*, 6, 447-452.

-STEVENS, C.; LEMPERT, N.; FREED, B.M. (1991). "The effects of immunosuppressive agents on *in vitro* production of human immunoglobulins." *Transplantation*, 51, 1240-1244.

-STITZ, L. (1992). "Induction of antigen-specific tolerance by cyclosporin A." *Eur. J. Immunol.* 22, 1995-2001.

-STITZ, L.; SCHILKEN, D.; FRESE, K. (1991). "Atypical dissemination of the highly neurotropic borna disease virus during persistent infection in cyclosporine A-treated, immunosuppressed rats." *J. Virol.*, 65, 457-460.

-STITZ, L.; SOEDER, D.; DESCHL, U.; FRESE, K.; ROTT, R. (1989). "Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently borna disease virus-infected rats by cyclosporine." *J. Immunol.*, 143, 4250-4256.

-STRASSER, A.; HARRIS, A.W.; JACKS, T.; CORY, S. (1994). "DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by bcl-2." *Cell*, 79, 329-339.

-STRAUCHEN, J.A.; BREAKSTONE, B.A. (1987). "IL-2 receptor expression in human lymphoid lesions. Immunohistochemical study of 166 cases." *Am. J. Pathol.*, 126, 3, 506-512.

-STRAYER, D.S.; DOMBROWSKI, J. (1988). "Immunosuppression during viral oncogenesis. V. Resistance to virus-induced immunosuppressive factor." *J. Immunol.*, 141, 347-351.

-STRAYER, D.S.; KORBER, K.; DOMBROWSKI, J. (1988). "Immunosuppression during viral oncogenesis. IV. Generation of soluble virus-induced immunologic suppressor molecules." *J. Immunol.*, 140, 2051-2059.

-SUBAK-SHARPE, I.; DYSON, H.; FAZAKERLEY, J. (1993). "*In vivo* depletion of CD8⁺ T cells prevents lesions of demyelination in Semliki Forest virus infection."

J. Virol., 67, 7629-7633.

-SUDA, T.; TAKAHASHI, T.; GOLSTEIN, P.; NAGATA, S. (1993). "Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the TNF family." *Cell*, 75, 1169-1178.

-SUN, D.Y.; JIANG, S.; ZHENG, L.M.; OJCIUS, D.M.; YOUNG, J.D-E. (1994). "Separate metabolic pathways leading to DNA fragmentation and apoptotic chromatin condensation." *J. Exp. Med.*, 179, 559-568.

-SURH, C.D.; SPRENT, J. (1994). "T-cell apoptosis detected *in situ* during positive and negative selection in the thymus." *Nature*, 372, 100-103.

-SUSA, M.; KONIG, M.; SAALMULLER, A.; REDDEHASE, M.J.; THIEL, H.J. (1992). "Pathogenesis of Classical Swine Fever: B-lymphocyte deficiency caused by Hog Cholera Virus." *J. Virol.*, 66, 2, 1171-1175.

-SWAT, W.; IGNATOWICZ, L.; KISIELOW, P. (1991). "Detection of apoptosis of immature CD4⁺8⁺ thymocytes by flow cytometry." *J. Immunol. Methods*, 137, 79-87.

-TABARÉS, E.; RUIZ-GONZALVO, F. (1983). Congreso Nacional de Microbiología, Valladolid, España.

-TABARÉS, E.; SÁNCHEZ-BOTIJA, C. (1979). "Synthesis of DNA in cells infected with African Swine Fever virus." *Arch. Virol.*, 61, 49-59.

-TABARÉS, E.; MARCOTEGUI, M.A.; FERNÁNDEZ, M.; SÁNCHEZ-BOTIJA, C. (1980). "Proteins specified by ASFV. I. Analysis of viral structural proteins and antigenic properties." *Arch. Virol.*, 66, 107-117.

-TABARÉS, E.; MARTÍNEZ, J.; RUIZ-GONZALVO, F.; SÁNCHEZ-BOTIJA, C. (1980a). "Proteins specified by ASFV. II. Analysis of proteins in infected cells and antigenic properties." *Arch. Virol.*, 66, 119-132.

-TABARÉS, E.; MARTÍNEZ, J.; MARTÍN, E.; ESCRIBANO, J.M. (1983). "Proteins specified by African Swine Fever Virus. IV glycoproteins and phosphoproteins." *Arch. Virol.*, 77, 167-180.

-TAKADA, K.; KATAYAMA, N.; KINYAMA, A.; USUDA, H. (1993). "Distribution characteristics of immunosuppressants FK506 and CsA in the blood compartment." *Biopharm. Drug. Dispos.*, 14, 659-671.

-TAKAI, K.; TSUCHIDA, M.; KONISHI, M.; TOKUDA, N.; FUJIKURA, Y.; JOJIMA, K.; FUKUMOTO, T. (1991). "Immunosuppressive effects of FK506 on rat lymphoid organs." *Transplan. Proc.*, 23, 2964-2966.

- TAKEUCHI, Y.; HABU, S.; OKUMARA, K.; SUZUKI, G. (1989). "CsA and anti-Ia antibody cause a maturation defect of CD4⁺8⁺ cells in organ-cultured fetal thymus." *Immunology*, 66, 362-367.
- TAN, E.M. (1994). "Autoimmunity and apoptosis." *J. Exp. Med.*, 179, 1083-1086.
- TARDIEU, M.R.; EPSTEIN, R.L.; WEINER, H.L. (1982). "Interaction of viruses with cell surface receptors." *Int. Rev. Cytol.*, 80, 27-61.
- TAYLOR, B.C.; STOTT, J.L.; THURMOND, M.A.; PICANSO, J.P. (1992). "Alteration in lymphocyte subpopulations in bovine leukosis virus-infected cattle". *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 31, 35-47.
- TAYLOR-WIEDEMAN, J.; SISSONS, J.G.P.; BORYSIEWICZ, L.K.; SINCLAIR, J.H. (1991). "Monocytes are a major site of persistence of human CMV in peripheral blood mononuclear cells." *J. Gen. Virol.*, 72, 2059-2064.
- TERAI, C.; KORNBLUTH, R.S.; PAUZA, C.D.; RICHMAN, D.D.; CARSON, D.A. (1991). "Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1." *J. Clin. Invest.*, 87, 1710-1715.
- TERSTAPPEN, L.W.M.M.; MEINERS, H.; LOKEN, M.R. (1989). "A rapid sample preparation technique for flow cytometric analysis of immunofluorescence allowing absolute enumeration of cell subpopulations." *J. Immunol. Meth.*, 123, 103-112.
- TERSTAPPEN, L.W.M.M.; SHAH, V.O.; CONRAD, M.P.; RECKTENWALD, D.; LOKEN, M.R. (1988). "Discriminating between damaged and intact cells in fixed flow cytometric samples." *Cytometry*, 9, 477-484.
- THIRIART, C.; GOUDSMIT, J.; SCHELLEKENS, P.; BARIN, F.; ZAGURY, D.; DE WILDE, M.; BRUCK, C. (1988). "Antibodies to soluble CD4 in HIV-1 infected individuals." *AIDS*, 2, 345-351.
- TIZARD, I. (1992). "Veterinary Immunology. An introduction." Fourth edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- TRAUTWEIN, G. (1992). "Immune mechanisms in the pathogenesis of viral diseases: a review." *Vet. Microbiol.*, 33, 19-34.
- TRENN, G.; TAFFEN, R.; HOHMAN, R.; KINCAID, R.; SHEVACH, E.M.; SITKOVSKY, M. (1989). "Biochemical characterization of the inhibitory effect of CsA on cytolytic T lymphocyte effector functions." *J. Immunol.*, 142, 3796-3802.
- TRINCHIERI, G. (1989). "Biology of Natural Killer cells." *Adv. Immunol.*, 47, 187-376.

- TSUBATA, T.; WU, J.; HONJO, T. (1993). "B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40." *Nature*, 364, 645-648.
- TYLER, K.L.; FIELDS, B.N. (1990). "Pathogenesis of viral infections." in *Virology*, second edition, edited by B.N. Fields; D.M. Knipe *et al.*, Raven Press. Ltd., New York.
- UEDA, Y.; ITO, M.; TAGAYA, J. (1969). "A specific surface antigen induced by poxvirus." *Virology*, 38, 180-182.
- UEDA, Y.; TAGAYA, J.; AMANO, H.; ITO, M. (1972). "Studies on the early antigens induced by vaccinia virus." *Virology*, 49, 794-800.
- UEHARA, T.; MIYAWAKI, T.; OHTA, K.; TAMARU, Y.; YOKOI, T.; NAKAMURA, S.; TANIGUCHI, N. (1992). "Apoptotic cell death of primed CD45RO⁺ T lymphocytes in Epstein Barr Virus-induced infectious mononucleosis." *Blood*, 80, 2, 452-458.
- URDAHL, B.K.; PARDOLL, D.M.; JENKINS, M.K. (1992). "Self-reactive T cells are present in the peripheral lymphoid tissues of CsA treated mice." *Int. Immunol.*, 4, 1341-1349.
- URZAINQUI, A.; TABARÉS, E.; CARRASCO, L. (1987). "Proteins synthesized in African swine fever virus-infected cells analyzed by two-dimensional gel electrophoresis." *Virology*, 160, 286-291.
- VAHLNE, A.; LARSSON, P.A.; HORAL, P.; AHLMÉN, J.; SVENNERHOLM, B.; GRONOWITZ, J.S.; OLOFSSON, S. (1992). "Inhibition of herpes simplex virus production *in vitro* by Cyclosporin A." *J. Arch. Virol.*, 122, 61-75.
- VAN KOOYK, Y.; VAN WIEL-VAN KEMENADE, E.; WEDER, P.; HUIJBENS, R.J.F.; FIGDOR, C.G. (1993). "Lymphocyte function-associated antigen 1 dominates very late antigen 4 in binding of activated T cells to endothelium." *J. Exp. Med.*, 177, 185-190.
- VEILLETE, A.; BOOKMAN, M.A.; HORAK, E.M.; BOLEN, J.B. (1988). "The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}." *Cell*, 55, 301-308.
- VIGARIO, J.D.; TERRINHA, A.M.; MOURA-NUNES, J.E. (1974). "Antigenic relationships among strains of African Swine Fever Virus." *Arch. für die ges. Virusforsch.*, 45, 272-277.
- VILLEDA, C.J.; WILLIAMS, S.M.; WILKINSON, P.J.; VIÑUELA, E. (1993). "Haemostatic abnormalities in ASF. A comparison of two virus strains of

different virulence (Dominican Republic '78 and Malta '78)." Arch. Virol., 130, 71-83.

-VILLEDA, C.J.; WILLIAMS, S.M.; WILKINSON, P.J.; VIÑUELA, E.(1993a). "Consumption coagulopathy associated with shock in acute ASF." Arch. Virol., 133, 467-475.

-VIÑUELA, E. (1985). "African swine fever virus." Curr. Top. Microbiol. Immunol. 116, 151-170.

-VIÑUELA, E. (1987). "Molecular biology of African Swine Fever virus." pp. 31-49. En Y. Becker (ed.) "Developments in Veterinay virology." Martinus Nijhoff Publishing, Dordrecht, The Netherlands.

-VON BOEHMER, H. (1993). "Tolerance by exhaustion." Nature, 362, 696-697.

-WALDMAN, H.; COBBOLD, S. (1993). "The use of mAb to achieve immunological tolerance." Immunol. Today, 14, 6, 247-251.

-WALDMAN, T.A. (1993). "The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention." Immunol. Today, 14, 6, 264-269.

-WALKER, C.M. (1993). "Non cytolytic control of HIV replication by CD8⁺ T cells." Sem. Immunol., 5, 195-201.

-WALKER, C.M.; LEVY, J.A.(1989). "A diffusible lymphokine produced by CD8⁺ T lymphocytes suppresses HIV replication." Immunology, 66, 628-630.

-WALKER, C.M.; ERICKSON, A.L.; HSUEH, F.C.; LEVY, J.A. (1991). "Inhibition of HIV replication in acutely infected CD4⁺ cells by CD8⁺ cells involves a noncytotoxic mechanism." J. Virol., 65, 5921-5927.

-WALSH, C.T.; ZYDOWSKY, L.D.; McKEON, F.D. (1992). "CsA, the cyclophilin class of peptidyl isomerases, and blockade of T cell signal transduction." J. Biol. Chem., 267, 13115-13118.

-WARDLEY, R.C. (1982). "Effect of ASF on lymphocyte mitogenesis." Immunology, 46, 215-220.

-WARDLEY, R.C.; WILKINSON, P.J. (1977). "The growth of virulent ASFV in pig monocytes and macrophages." J. Gen. Virol., 38, 183-186.

-WARDLEY, R.C.; WILKINSON, P.J. (1980). "Lymphocyte responses to ASFV infection." Res. Vet. Sci., 28, 185-189.

-WARDLEY, R.C.; WILKINSON, P.J. (1980a). "Detection of ASF antigen and

antibody by radioimmunoassay." *Vet. Microbiol.*, 5, 169-176.

-WARDLEY, R.C.; WILKINSON, P.J. (1985). "An immunological approach to vaccines against ASFV." *Vaccine*, 3, 54-56.

-WARDLEY, R.C.; ANDRADE, C. de M.; BLACK, D.N.; DE CASTRO, F.L.; ENJUANES, L.; HESS, W.R.; MEBUS, C. (1983). "African Swine Fever Virus. Brief review." *Arch. Virol.*, 76, 73-90.

-WARDLEY, R.C.; HAMILTON, F.; WILKINSON, P.J. (1979). "The replication of virulent and attenuated strains of ASFV in porcine macrophages." *Arch. Virol.*, 61, 217-225.

-WARDLEY, R.C.; NORLEY, S.G.; WILKINSON, P.J.; WILLIAMS, S. (1985). "The role of antibody in protection against ASFV." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 9, 201-212.

-WARDLEY, R.C.; NORLEY, S.G.; MARTINS, C.V.; LAWMAN, M.J.P. (1987). "The host response to African Swine Fever virus." *Prog. Med. Virol.*, 34, 180-192.

-WARDLEY, R.C.; WILKINSON, P.J.; HAMILTON, F. (1977). "ASFV replication in porcine lymphocytes." *J. Gen. Virol.*, 37, 425-427.

-WARR, G.A.; JAKAB, G.J.; HEARST, J.E. (1979). "Alterations in lung macrophage immune receptor(s) activity associated with viral pneumonia." *J. Reticuloendothel. Soc.*, 26, 357-366.

-WARREN, A.P.; DUCROQ, D.H.; LEHNER, P.J.; BORYSIEWICZ, L.K. (1994). "Human cytomegalovirus-infected cells have unstable assembly of MHC-I complexes and are resistant to lysis by cytotoxic T lymphocytes." *J. Virol.*, 68, 2822-2829.

-WARREN, J.S.; KUNKEL, S.L.; JOHNSON, K.J.; WARD, P.A. (1987). "In vitro activation of rat neutrophils and alveolar macrophages with IgA and IgG immune complexes. Implications for immune complex-induced lung injury." *Am. J. Pathol.*, 129, 3, 578-588.

-WARSHAUER, D.; GOLDSTEIN, E.; AKERS, T.; LIPPERT, W.; KIM, M. (1977). "Effect of influenza viral infection on the ingestion and killing of bacteria by alveolar macrophages." *Am. Rev. Respir. Dis.*, 115, 260-277.

-WEBB, D.R. (1991). "Mechanisms of peripheral tolerance: A workshop on antigen-specific suppression." *Cell Immunol.*, 136, 251-256.

-WEINHOLD, K.J.; LYERLY, H.K.; STANLEY, S.D.; AUSTIN, A.A.; MATTHEWS,

T.J.; BOLOGNESI, D.P. (1988). "HIV-1 gp120 mediated immune suppression and lymphocyte destruction in the absence of viral infection." *J. Immuno.*, 142, 3091-3097.

-WEINTRAUB, S.; DALES, S. (1974). "Biogenesis of poxvirus: genetically controlled modifications of structural and functional components of plasma membrane." *Virology*, 60, 96-127.

-WEISS, A.; IMBODEN, J.; HARDY, K.; MANGER, B.; TERHORST, C.; STOBO, J. (1986). "The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation." *Ann. Rev. Immunol.*, 4, 593-619.

-WESLEY, R.D.; PAN, I.C. (1982). "ASFV DNA: restriction endonuclease cleavage patterns of wild-type, Vero cell-adapted and Plaque-purified virus." *J. Gen. Virol.*, 63, 383-391.

-WESLEY, R.D.; TUTHILL, A.E. (1984). "Genome relatedness among ASFV field isolates by restriction endonuclease analysis." *Prev. Vet. Med.*, 2, 53-62.

-WHITE, D.J.G.; PLUMB, A.M.; PAWELEC, G.; BRONS, G. (1979). "CsA: an immunosuppressive agent preferentially active against proliferating T cells." *Transplantation*, 27, 1, 55-58.

-WHYARD, T.C.; WOOL, S.H.; LETCHWORTH, G.J. (1985). "Monoclonal antibodies against African Swine Fever viral antigens." *Virology*, 142, 416-420.

-WICKER, L.S.; BOLTZ, R.C.; MATT, V.; NICHOLS, Z.A.; PETERSON, L.B.; SIGAL, N.H. (1990). "Suppression of B cell activation by CsA, FK-506 and rapamycin." *Eur. J. Immunol.*, 20, 2277-2283.

-WILKINSON, P.J.; DONALDSON, A.I. (1977). "Transmission studies with ASFV." *J. Comp. Pathol.*, 87, 497-501.

-WILKINSON, P.J.; WARDLEY, R.C.; WILLIAMS, S.M. (1978). "The replication of ASFV in pig endothelial cells." *Br. Vet. J.*, 134, 280-282.

-WILLIAMS, G.T.; SMITH, C.A. (1993). "Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death." *Cell*, 74, 777-779.

-WIVIOTT, L.D.; WALKER, C.M.; LEVY, J.A. (1990). "CD8⁺ lymphocytes suppress HIV production by autologous CD4⁺ cells without eliminating the infected cells from culture." *Cell. Immunol.*, 128, 628-634.

-WONG, G.W.H.; CLARK-LEWIS, I.; McKIMIN-BRESCHKIN, J.L.; HARRIS, A.W.; SCHRADER, J.W. (1983). "IFN γ induces enhanced expression of Ia and IL-2 antigens on B lymphoid, macrophages and myeloid cell lines." *J. Immunol.*, 131,

- YAÑEZ, R.; RODRÍGUEZ, J.M.; RODRÍGUEZ, J.F.; VIÑUELA, E. (1994). "The complete nucleotide sequence of African Swine fever virus strain BA71V." 10th International Conference on Poxviruses and Iridoviruses. Banff.
- ZARLING, J.M.; LEDBETTER, J.A.; SIAS, J.; FULTZ, P.; EICHBERG, J.; GJESERT, G.; MORAN, P.A. (1990). "HIV-infected humans, but not chimpanzees, have circulating cytotoxic T lymphocytes that lyse uninfected CD4⁺ T cells." J. Immunol., 144, 2992-2998.
- ZIEGLER, K.; FRIMMER, M.; FRITZSCH, G.; KOEPESELL, H.(1990). "CsA binding to a protein component of the renal Na⁺-D-glucose cotransporter." J. Biol. Chem., 265, 3270-3277.
- ZINKERNAGEL, R.M.; ALTHAGE, A. (1977). "Antiviral protection by virus-immune cytotoxic T cells: infected target cells are lysed before infectious virus progeny is assembled." J. Exp. Med., 145, 644-651.
- ZINKERNAGEL, R.M.; DOHERTY, P.C. (1974)."Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." Nature, 248, 701-702.
- ZINKERNAGEL, R.M.; DOHERTY, P.C. (1974)."Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in LCM." Nature, 251, 547-548.
- ZINKERNAGEL, R.M.; DOHERTY, P.C. (1979). "MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function and responsiveness." Adv. Immunol., 27, 151-177.
- ZSAK, L.; ONISK, D.V.; AFONSO, C.L.; ROCK, D.L. (1993). "Virulent ASFV isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72 kDa viral protein." Virology, 196, 596-602.
- ZSAK, L.; AFONSO, C.L.; BRUN, A.; KUTISH, G.F.; LU, Z.; ONISK, D.V.; CALER, E.; ROCK, D.L. (1994). "Structural diversity in the african swine fever virus gene 23-NL does not affect virus growth *in vitro* or viral virulence in swine." 10th International Conference on Poxviruses and Iridoviruses. Banff. Canada.
- ZYCHLINSKY, A.; ZHENG, L.M.; LIU, C.C.; YOUNG, J.D.E. (1991). "Cytolytic lymphocytes induce apoptosis and necrosis in target cells." J. Immunol., 146, 393-400.

RESUMEN

En el trabajo que hemos realizado describimos la caracterización morfofuncional de algunos componentes del sistema inmune porcino en su interacción con el virus de la Peste Porcina Africana. El mismo sistema descriptivo se sigue para animales que fueron inmunosuprimidos mediante la administración con ciclosporina A desde el día anterior a la infección experimental y durante el desarrollo de la misma.

La inmunosupresión farmacológica incidió negativamente sobre las respuestas de tipo humoral (producción de anticuerpos y funcionalidad de los mismos), y produjo un retraso en algunas respuestas de tipo celular.

A lo largo de la infección con el modelo atenuado E75CV₁-4 hemos observado una leucopenia transitoria acompañada de una neutrofilia y linfopenia. En sangre periférica, mediante la utilización de técnicas de citometría de flujo, se describió un incremento de las poblaciones de linfocitos CD8⁺, CD4⁺ y linfocitos B, entre los días 7 y 9 postinfección. Estos incrementos se acompañaron de una mayor expresión de los antígenos de histocompatibilidad y de un mayor porcentaje de monocitos circulantes. A partir de la tercera semana postinfección se observó una menor expresión de los antígenos de los complejos de histocompatibilidad I y II, así como del receptor de IL-2, argumentando sobre su posible importancia en el desarrollo de infecciones persistentes.

Asimismo se describen las variaciones de estas poblaciones circulantes en el modelo virulento E70, y en los modelos de inmunosupresión farmacológica.

Posteriormente se evaluó la capacidad funcional en linfocitos de sangre periférica, mediante la estimulación con el mitógeno concanavalina A de los linfocitos extraídos de animales infectados, así como en linfocitos infectados *in vitro*. En ambos casos se observó una inmunosupresión inducida por el virus, si bien existió respuesta en el modelo atenuado a elevadas dosis de mitógeno, así como tras la adición de IL-2 en el medio de cultivo.

Finalmente se han caracterizado modelos de inhibición y de estimulación de la apoptosis celular. Discutimos su papel en la patogenia de la infección, y su correlación con lo observado *in vivo*.

SUMMARY

In different experiments we describe the morphofunctional characterization of the porcine immune system in African Swine Fever infection. Similar description is done for animals immunosuppressed with cyclosporine A in different moments along the infection.

Pharmacological immunosuppression affected negatively the humoral response (antibody production and functionality) and it produced a delay in some cellular immune responses.

In the attenuated model of infection with the ASFV strain E75CV₁-4 we have observed a transient leukopenia with neutrophilia and linfopenia.

We also describe an increment in CD8⁺, CD4⁺, and B lymphocyte subpopulations in peripheral blood by flow cytometry, between post-infection days 7-9. At the same time it was observed an increment in major histocompatibility complex expression and a higher percentage of peripheral blood monocytes. From the third week post-infection, it was described a downmodulation of major histocompatibility complex and IL-2 receptor expression. We discuss the possible role of these variations in the establishment of persistent infections.

We have also characterized the peripheral blood cell variations in the E70 strain, as a virulent model, and in its immunosuppressed counterparts.

Afterwards, we have considered the functional capacity of lymphocytes in experimentally infected animals and in mononuclear cell cultures after the stimulation with the mitogen concanavaline A. We have noticed a virally induced immunosuppression in both systems. This immunosuppression was contrarrested after the stimulation of the attenuated strain infected cells with high mitogen dosis, as well as after the addition of IL-2 in the culture medium.

ASFV *in vitro* models of programmed cell death inhibition and induction are described. We discussed its role in the pathogenesis of ASF infection and *in vivo* correlations.